UNIVERSITY OF HAWAII LIBRARY
NOV 22 '61

EXPERIENTIA

REVUE MENSUELLE DES SCIENCES PURES ET APPLIQUÉES
MONATSSCHRIFT FÜR DAS GESAMTE GEBIET DER NATURWISSENSCHAFT
RIVISTA MENSILE DI SCIENZE PURE E APPLICATE
MONTHLY JOURNAL OF PURE AND APPLIED SCIENCE

Editores: P. HUBER, Basel · R. MATTHEY, Lausanne · A. v. MURALT, Bern · L. RUZICKA, Zürich

Redactor: H. MISLIN, Basel · Mainz

BIRKHÄUSER VERLAG BASEL (SCHWEIZ)

SOMMAIRE – INHALT – SOMMARIO – CONTENTS

Articles généraux – Übersichtsreferate
Articoli riassuntivi – Surveys

ARNE TISELIUS: Einige neue Trennungsmethoden und ihre Anwendung auf biochemische und organisch-chemische Probleme 433

Brèves communications – Kurze Mitteilungen
Brevi comunicazioni – Brief Reports

J. RAAFLAUB: Über die Basizität der Knochenmineralien . . . 443

U. P. GEIGER und E. CLASS: Beobachtung eines reversiblen Komproportionierungseffektes unter Lichteinwirkung bei Chrom-tris-2,2′-dipyridyl-Komplexen 444

D. V. KRISHNA MURTHY and P. L. NARASIMHA RAO: Structure of Morellin 445

P. SZAFRAŃSKI und H. WEHR: Über den Einbau ^{14}C-markierter Aminosäuren in Zellkernfraktionen aus Meerschweinchenleberzellen *in vitro* 446

M. GOLDSTEIN and J. F. CONTRERA: Studies on Enzymic β-Hydroxylation of Phenylethyl Amines 447

G. G. NATHANSOHN, G. WINTERS, and E. TESTA: 16β-Methylprednisone from Hecogenin 448

M. B. LIPSETT and B. HÖKFELT: Conversion of 17α-Hydroxypregnenolone to Cortisol 449

J. R. PASQUALINI et M. F. JAYLE: Identification du glucosiduronate de 5β-pregnane 3α,21-diol 20-one (THDOC) après administration de cortexone 450

A. A. HADJIOLOV and M. D. DABEVA: Loss of Tryptophan Pyrrolase Cofactor from Liver Cytoplasmic Structures of 3′-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene Fed Rats 452

U. AMBANELLI, F. BONATI und G. SALVI: Das Coenzym A in leukämischem Blut 453

S. BERNSTEIN, E. W. CANTRALL, J. P. DUSZA, and J. P. JOSEPH: C16-Methyl Derivatives of Progesterone and 17α-Acetoxyprogesterone: Preparation and Biological Activities 454

B. S. KAUSHIVA: Structural Basis of Nucleolar Function . . . 455

J. M. REINER: Mechanisms of Transfer between Environment and Cell 457

YOSHIO MASUI: Mesodermal and Endodermal Differentiation of the Presumptive Ectoderm of *Triturus* Gastrula through Influence of Lithium Ion 458

H. J. GAMBLE and J. G. STEMPAK: Observations upon the Mast Cells of Rat Foetal Tissues 460

P. EHRHARDT: Zur Nahrungsaufnahme von *Megoura viciae* Buckt., einer phloemsaugenden Aphide (*Homoptera, Rhynchota*) 461

K. SCHREIBER, G. OSSKE und G. SEMBDNER: Identifizierung von β-Sitosterin als Hauptsterin des Kartoffelkäfers (*Leptinotarsa decemlineata* Say) 463

W. M. SCHLEIDT: Operative Entfernung des Gehörorganes ohne Schädigung angrenzender Labyrinthteile bei Putenküken . . . 464

H. AEBI, J. P. HEINIGER, R. BÜTLER, and A. HÄSSIG: Two Cases of Acatalasia in Switzerland 466

A. STOLK: Cholinesterase Activity within the Renal Tissue of *Helostoma temmincki* 466

K. KUBÁT, V. FLANDERA, P. HAHN, and O. KOLDOVSKÝ: The Effect of Early Weaning on Spermiogenesis in Adult Rats . . . 467

DAYA BHANU: Modification in the Fecundity and Life Span of the Moth *Corcyra cephalonica* Staint. Receiving Dietary Antibiotics in the Larval Stages 468

K. KRNJEVIĆ and J. W. PHILLIS: Sensitivity of Cortical Neurones to Acetylcholine 469

R. S. KAPIL, NITYA ANAND, M. M. VOHRA, and J. D. KOHLI: New Central Stimulants 469

S. TALANTI and E. KIVALO: The Infundibular Recess in the Brain of *Camelus dromedarius* with Particular Reference to its Neurosecretory Pathways into the Third Ventricle 470

E. V. ZEJMAL and Z. VOTAVA: Antagonism Against the Arecoline Tremors of Oxyphenonium and its Tertiary Analogue after Intravenous and Intracerebral Administration in Mice 471

J. DAVÍDEK and G. JANÍČEK: Polarographic Determination of DDT (Pro Experimentis) 473

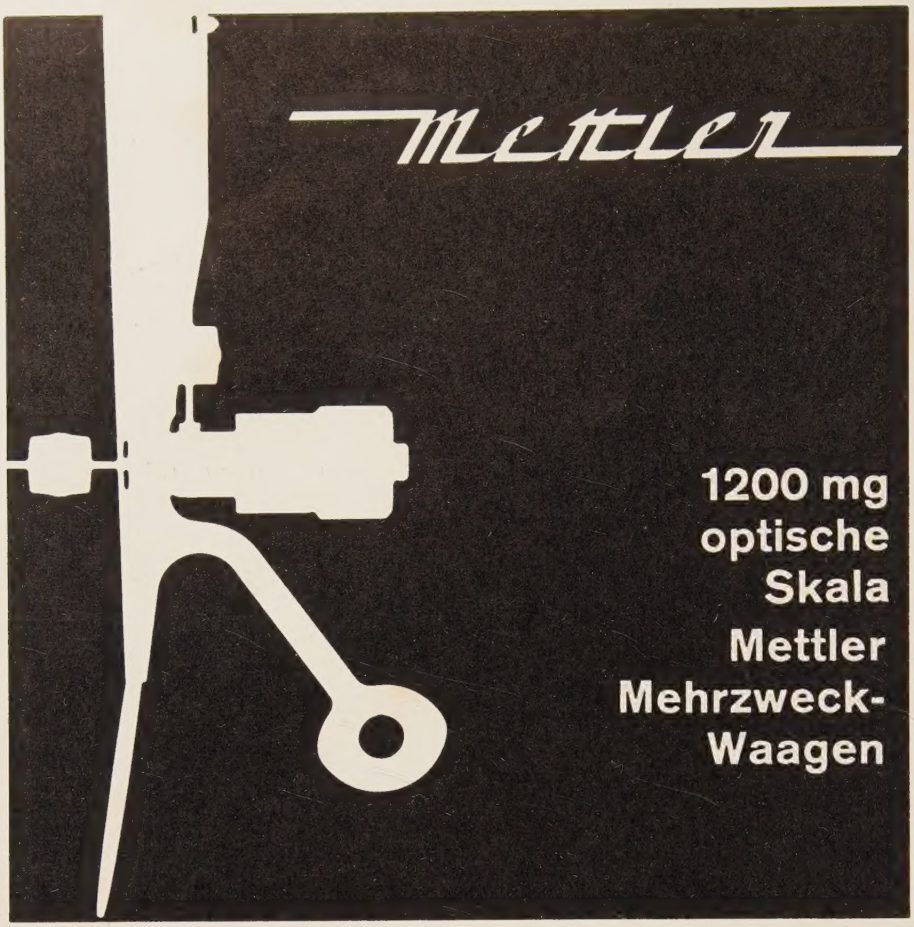
B. J. R. NICOLAUS, C. CORONELLI und A. BINAGHI: Mikrobiologischer Nachweis von Antibiotika auf Dünnschichtchromatogrammen (Pro Experimentis) 473

J. BLATTNÁ and J. DAVÍDEK: A Simple Detection of Fat-Soluble Vitamins on Aluminia Thin Layer-Chromatograms (Pro Experiments) 474

W. FYG: Eine einfache Methode zur Gewinnung von Exuvialflüssigkeit bei der Honigbiene (*Apis mellifica* L.) (Pro Experimentis) 474

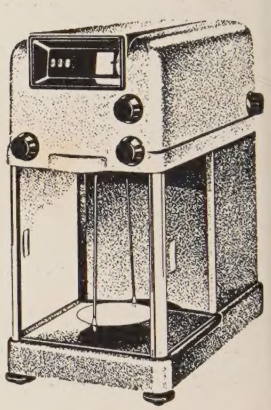
CH. MEYSTRE, K. HEUSLER, J. KALVODA, P. WIELAND, G. ANNER und A. WETTSTEIN: Neue Substitutionsreaktionen bei Steroiden (Studiorum Progressus) 475

Corrigenda – Congressus 480



E. Mettler
Pelikanstrasse 19
Zürich

Garantierte
Genauigkeit
Konstante
Empfindlichkeit
Bessere
Reproduzierbarkeit



M 1

Liste des annonceurs – Verzeichnis der Inserenten – Elenco degli inserzionisti – List of advertisers – Experientia XVII/10

Bios Laboratories, Inc., New York
Bracco Industria Chimica S.p.A., Milano
CIBA Aktiengesellschaft, Basel
Ganz Optar AG, Zürich
J.R. Geigy AG, Basel
S. Harnisch, Joinville
F. Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel
Lonza AG, Basel
E. Mettler, Zürich
S. Petit, Vincenne
Sandoz AG, Basel
Schwitter AG, Basel
M. Thomas, Paris

L'EXPERIENTIA paraît le 15 de chaque mois. Vente et abonnement dans toutes les librairies suisses et étrangères, ou directement chez l'éditeur. Abonnement pour un an frs. 74.–. Ce prix s'entend en francs suisses.

Die EXPERIENTIA erscheint am 15. jedes Monats und kann im In- und Ausland durch jede Buchhandlung oder direkt vom Verlag bezogen werden. Der Abonnementspreis beträgt Fr. 74.–.

Insertionspreise: $^1/_1$ Seite Fr. 220.–, $^1/_2$ Seite Fr. 132.–, $^1/_4$ Seite Fr. 77.–. Inseratenannahme durch den Verlag.

EXPERIENTIA esce al 15 di ogni mese e può essere richiesta ad ogni libreria svizzera o estera, o anche direttamente alla casa editrice. L'abbonamento annuo è di fr. 74.–. Il prezzo è inteso in valuta svizzera.

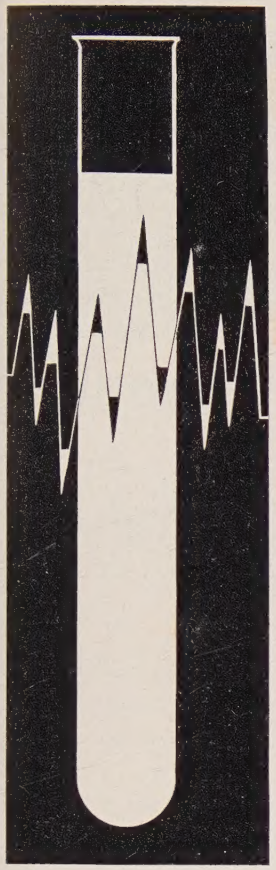
EXPERIENTIA is published on the 15th of every month and can be obtained in any country through the booksellers or from the publishers. The price by annual subscription is sFr. 74.–. Price in Swiss currency.

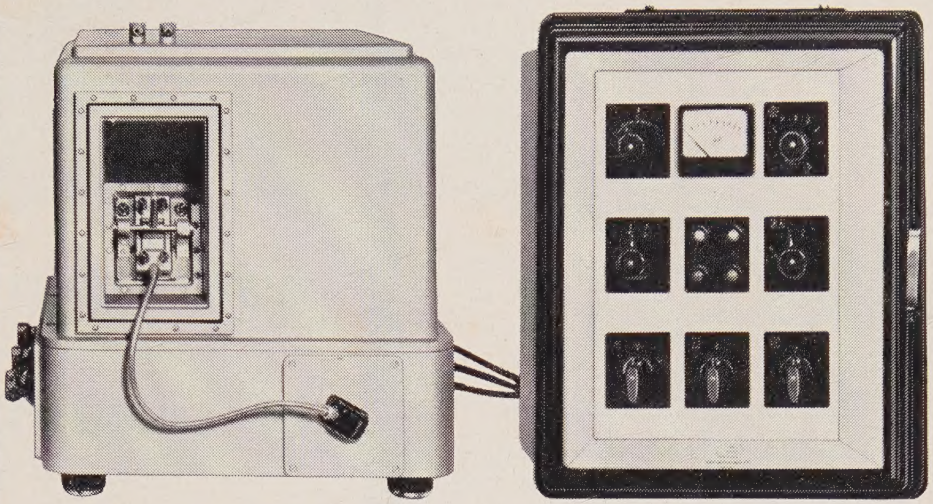
Prices for advertising: $^1/_1$ page fr. 220.–, $^1/_2$ page fr. 132.–, $^1/_4$ page fr. 77.–. Advertisements should be sent to the publishers.

© *1961 Birkhäuser Verlag, Basel 10 (Schweiz), Telephon (061) 23 18 10; Telegrammadresse: Edita Basel*

Printed in Switzerland by Birkhäuser AG., Basel

ZEISS Refraktograph 2





Der Zeiss Refraktograph ist die Kombination eines Abbe-Refraktometers mit einer photoelektrischen Anzeige- und Steuereinrichtung.
Er dient der kontinuierlichen selbsttätigen Messung, Fernübertragung von Messwerten und der automatischen Regelung des Fabrikationsprozesses.

GANZ *Optar* AG

Zürich, Bahnhofstr. 40
Tel. 051/25 16 75

Lonza

Lösungsmittel
Methylacetat, Aethylacetat, Butylacetat, Lösungsmittelgemische, n-Butanol

Organische technische Produkte
Formaldehyd, Acetaldehyd, Paraldehyd, Crotonaldehyd, Essigsäure, Essigsäureanhydrid, Natriumacetat, Vinylacetat monomer, Anilinöl, Nitrobenzol, Dicyandiamid, Metaldehyd

Organische Zwischenprodukte
Acetessigäthylester, Acetessigmethylester, Phenylmethylpyrazolon, Acetessiganilid, Acetessig-o-chloranilid und andere Acetessigarylamide, Acetylaceton, Methyläthylpyridin, Nikotinsäure, Nikotinsäureamid, Acetonitril, Isobuttersäurenitril

Kunststoffe
Polyvinylchlorid in verschiedenen Qualitäten, Vinylchlorid/Vinylacetat-Mischpolymerisate, Polyvinylacetat-Dispersionen VIPOLIT®
Polymethylmethacrylat in Platten VOS®

Stickstoffprodukte
Ammoniak, Salpetersäure, Ammonnitrat, Natriumnitrat, Natriumnitrit, Ammonsulfat, Harnstoff

Stickstoff- und kombinierte Dünger
Kalksalpeter, Ammonsalpeter, Kalkstickstoff, Ammonsulfat, Nitrophosphat, Nitrophosphatkali, Nitrophosphatkali borhaltig, Volldünger Lonza®, Rebendünger Lonza®, Tabakdünger Lonza®, Lonzin® für Topfpflanzen, Composto Lonza®

Calciumcarbid

Ferro-Legierungen
Ferrosilicium, Ferrosilicium-Aluminium (Alsimin®, Feralsit®), Ferrosilicium-Mangan-Aluminium (Simanal®)

Siliciummetall (Reinsilicium)

Siliciumcarbid für schleif- und feuerfeste Zwecke sowie Lonsicar® als Betonhartstoff

Graphit min. 99,9 % C

LONZA ELEKTRIZITÄTSWERKE + CHEMISCHE FABRIKEN
AKTIENGESELLSCHAFT BASEL

*

WE NEVER
SAY "NO"

WE SHIP YOUR
ORDER TODAY
(Air Mail or Parcel Post, as you wish)

18,000
CHEMICALS FOR
IMMEDIATE DELIVERY
FROM STOCK.
LARGEST VARIETY
ANYWHERE

Ask for our new catalogue

BIOS *Laboratories, Inc.*
17 West 60th St., New York City 23, U.S.A.
Kabeladresse: BIOSLAB

Labor für organische Synthesen **Seine-Maritime** bietet feste und zukunftsreiche Stelle für

erfahrenen Chemiker

oder

Ingenieur-Chemiker

für Versuche und Richtigstellungen. Interessanter Lohn. Wohnung möglich.

Senden Sie bitte Lebenslauf an:
S. PETIT, 94, Avenue Auber,
VINCENNE (Seine), (France).

Bedeutendes Laboratorium sucht für die Leitung einer neuen Forschungsabteilung erfahrenen, initiativen

Pharmakologen

Sehr gute Zukunftsaussichten. Absolute Diskretion zugesichert.

1. Zuschrift an M. Thomas, Ref. S 388, 18, rue de la Chaussée d'Autin, PARIS 9°, France, der die Weiterleitung besorgt.

Bedeutendes Versuchslaboratorium sucht dynamischen, initiativen

Arzt **Apotheker oder Wissenschafter**

spezialisiert in der Pharmakologie. Gute Zukunftsaussichten.

Senden Sie bitte handgeschriebenen Lebenslauf mit Photo an:
Monsieur S. Harnisch, 10, rue Jean Mermoz, Joinville (Seine), France, der die Weiterleitung besorgt.

Originalpräparate der Roche-Forschung

1898 «SIROLIN»
Hustenmittel

1904 «DIGALEN»
gereinigtes
Digitalpräparat

1909 «PANTOPON»
gereinigtes
Opiumalkaloid

1919 «SPASMALGIN»
Spasmolyticum,
Analgeticum

1921 «ALLONAL»
Hypnoticum

1931 «PROSTIGMIN»
Vagotonicum

1934 «REDOXON»
Vitamin C

1936 «BENERVA»
Vitamin B_1

1938 «LIQUEMIN»
Heparinpräparat

1939 «NARCONUMAL»
Narkotikum

1940 «SYNKAVIT»
Vitamin K

1942 «BECOZYM»
Vitamin-B-
Komplex-Faktoren

1949 «GANTRISIN» ROCHE
Sulfonamid

1949 «RONICOL»
Vasodilatator

1951 «RIMIFON»
Antituberkuloticum

1954 «ROMILAR»
Hustenmittel

1956 D-CYCLOSERIN «ROCHE»
Antibioticum
gegen TBC

1959 «MADRIBON»
Depot-Sulfonamid

1960 «MARPLAN»
Antidepressivum

1960 «TERSAVID»
gegen Angina pectoris

1960 «TARACTAN»
Neurolepticum

1960 «LIBRIUM»
gegen Angst
und Spannung

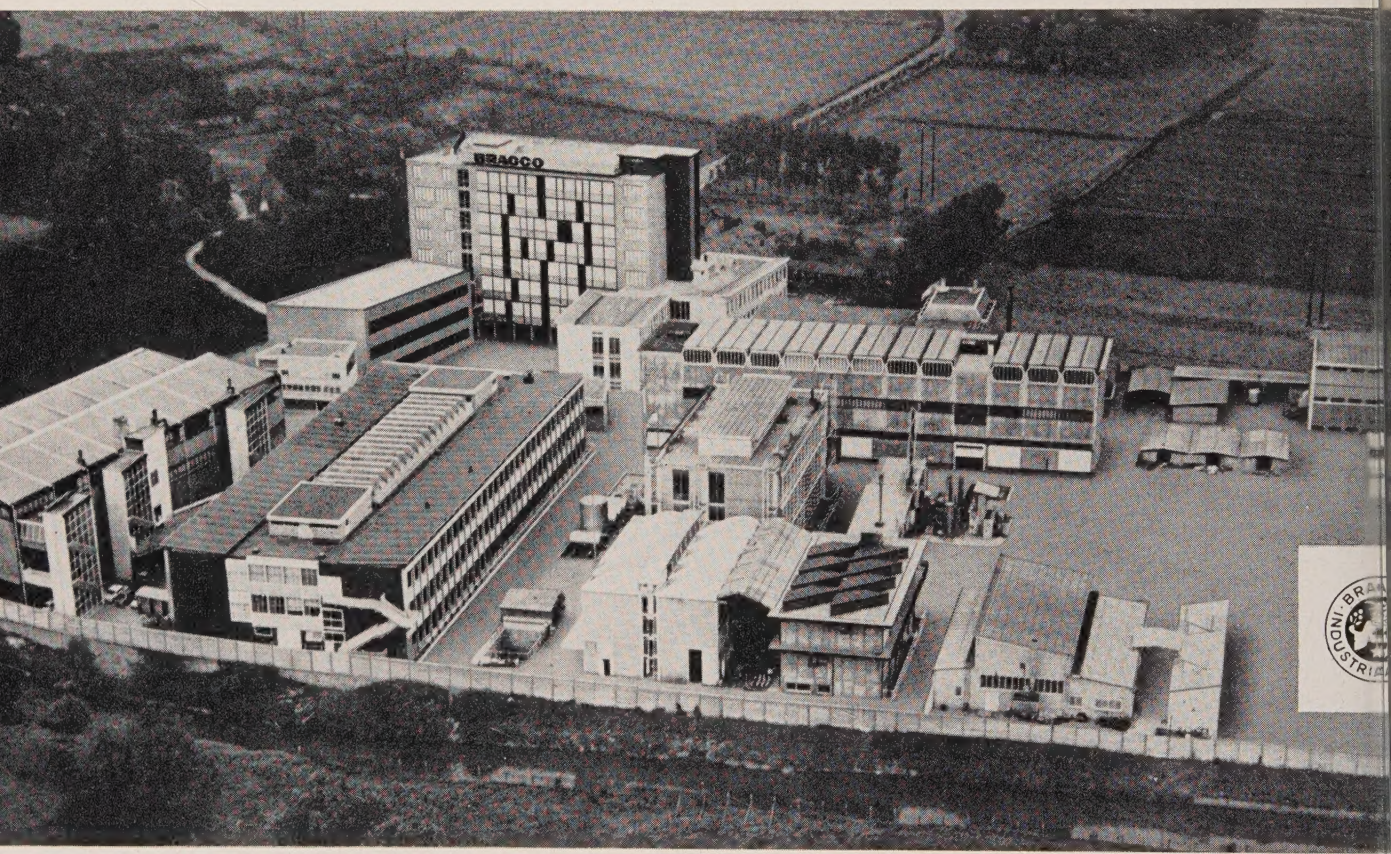
**...und weitere
in Vorbereitung**

F. Hoffmann-La Roche & Co. A.G. Basel

BRACCO

INDUSTRIA CHIMICA S.p.A.

MILANO - VIA E. FOLLI, 50 (ITALIEN)



SPEZIALPRÄPARATE

WIRKSUBSTANZEN FÜR
DIE PHARMAZEUTISCHE INDUSTRIE

RÖNTGENKONTRASTMITTEL

EXPERIENTIA

Vol. XVII – Fasc. 10 Pag. 433–480 15. X. 1961

Einige neue Trennungsmethoden und ihre Anwendung auf biochemische und organisch-chemische Probleme*

Von ARNE TISELIUS**

Trennmethoden von ausgeprägter Spezifität sind von grundlegender Bedeutung für die organische und biologische Chemie – ja für die Chemie überhaupt. Schon die Definition des Begriffes «chemische Verbindung» zum Unterschied von mechanischer Mischung fusst, prinzipiell gesprochen, auf Trennungsvorgängen. Selbstverständlich denkt man in erster Linie an präparative Arbeiten, wenn man die Bedeutung und die Bewertung verschiedener Trennungsoperationen diskutiert. Bei biochemischen Problemstellungen rücken einige besonders für biologisches Material wichtige Gesichtspunkte in den Vordergrund. Erstens sind derartige Systeme meistens sehr kompliziert zusammengesetzt und enthalten eine Menge hochmolekularer Substanzen, die sich oft nur sehr schwer trennen lassen und die auch meist besonders schwierig zu charakterisieren sind, wenigstens wenn sie nicht durch sehr spezifische biochemische Reaktionen gekennzeichnet werden können. Dazu kommt ein anderes Problem. Manche biochemische Substanzen sind unter den Bedingungen gebräuchlicher chemischer Operationen instabil, und dies gilt noch mehr für viele der spezifischen Komplexe, die in der lebenden Zelle ausserordentlich wichtige Funktionen ausüben. Deshalb muss man in der Biochemie besonders auf möglichst schonende – aber doch spezifisch auswählende – Methoden Wert legen. Es kommen hier vor allem eine Reihe von Methoden in Frage, die sich im Prinzip auf einfache physikalische Erscheinungen gründen; ihre neuartige Ausführung und Anwendung möchte ich in dieser Vorlesung durch einige Beispiele, vor allem aus meinem eigenen Laboratorium, beleuchten. Es handelt sich dabei nicht nur um präparative Probleme, sondern manchmal auch um vorläufige Charakterisierungen, wie sie bisher nur schwer möglich waren, die jedoch – in Erwartung einer endgültigen chemischen Charakterisierung – oft wertvoll sind. Darüber hinaus tritt die Anwendung neuartiger Trennungsmethoden als Hilfsmittel der Strukturbestimmung, besonders von komplizierten hochmolekularen Verbindungen, mehr und mehr in den Vordergrund. Es genügt wohl, hier auf die genaue Bestimmung der Aminosäure-Sequenz in Eiweissmolekülen durch SANGER und seine Nachfolger und auf die ausschlaggebende Rolle, die neue chromatographische und elektrophoretische Trennungsmethoden in diesen Arbeiten spielen, hinzuweisen. Die Strukturbestimmung beruht hiebei bekanntlich auf einer Auftrennung und Charakterisierung einer grossen Anzahl von verschiedenen Bruchstücken der Proteinmoleküle, wie sie in partiellen Hydrolysaten vorkommen – ein Problem, dessen Lösung noch vor 15 Jahren fast hoffnungslos erschien.

Es ist dies gleichzeitig eine sehr schöne Illustration, wie biochemische Problemstellungen – auch rein methodisch – allmählich infolge ihrer vertieften Betrachtungsweise in die reine organische Strukturchemie gelangen. Weitere Beispiele findet man jetzt fast täglich in den chemischen und biochemischen Zeitschriften.

Das Prinzip der Ableitung einer komplizierten Struktur durch Analyse von Mischungen ihrer Strukturfragmente ist aber nicht nur für die Chemie der hochmolekularen Körper, wie sie in der Natur vorkommen, von Bedeutung, sondern auch für biologische und biochemische Strukturprobleme im allgemeinen, wo sich jetzt sehr verlockende Perspektiven öffnen. Ich denke dabei an Strukturen, die oft teilweise durch direkte Beobachtung im Mikroskop oder Elektronenmikroskop bestimmt werden können. Als Beispiel zeigt Figur 1 eine elektronenmikroskopische Aufnahme der einzelnen Moleküle des Hämocyanins von *Helix pomatia* (Molekulargewicht ca. 8 Millionen). Man erkennt hier eine gewisse Struktur der Moleküle, die ja aus Submolekülen bestehen. Die chemischen und funktionellen Einzelheiten derartiger Strukturen sind noch ungenügend bekannt. Zu ihrer Kenntnis genügt meistens die direkte Beobachtung nicht, vielmehr sollte man mög-

* Dritte PAUL-KARRER-Vorlesung gehalten an der Universität Zürich am 5. Juli 1961.

** Biochemisches Institut der Universität Uppsala (Schweden).

lichst auch mit den Strukturelementen gewisse Manipulationen ausführen können, besonders in funktioneller Hinsicht. Ausserdem liegen hier prinzipiell ähnliche Möglichkeiten einer Strukturbestimmung vor wie bei der Sequenzbestimmung der Aminosäurereste in den Polypeptidketten der Proteine. Eine Analyse von Strukturfragmenten sollte nämlich auch hier grundsätzlich wichtige Schlussfolgerungen erlauben, gerade auch über die Organisation der lebenden Zelle oder biologische Strukturen überhaupt. Dabei sollte eine vollständigere Information über die chemischen Affinitäten und Strukturbedingungen, die hier eine Rolle spielen, möglich sein, als man sie durch mikroskopische Studien allein erlangen kann. Wir bewegen uns da in einem Gebiet, das in chemischer Hinsicht grösstenteils eine *Terra incognita* ist, in dem Chemie und Biologie in auffallender Weise ineinandergreifen und dessen Bearbeitung auch für den Chemiker vielversprechend erscheint. Fortschritte auf diesem Gebiet müssen sehr eng mit der Entwicklung von Methoden zur Trennung von submikroskopischen und mikroskopischen Teilchen zusammenhängen.

Die Methoden, die ich hier näher diskutieren möchte, sind: Elektrophorese, Chromatographie, Verteilungsmethoden und teilweise auch Ultrazentrifugierung. Von diesen Methoden sind Elektrophorese und Ultrazentrifugierung bekanntlich ganz besonders schonend, da die Trennung einfach durch Wanderung der verschiedenen Komponenten einer Mischung in einem konstanten Medium zustande kommt. Diese beiden Verfahren wurden ja ursprünglich für kolloidale und hochmolekulare Körper benutzt, aber besonders die Elektrophorese kann jetzt unter gewissen technischen Voraussetzungen auch für niedrigmolekulare Substanzen angewandt werden. Die chromatographischen und Verteilungsmethoden sind oft weniger schonend, da sie besondere Affinitäten oder Löslichkeitsverhältnisse voraussetzen, was die Verwendung von etwas aggressiveren Lösungsmitteln notwendig machen kann. In der jüngsten Entwicklung auf diesen Gebieten ist deshalb im Hinblick auf die Trennung von instabilen hochmolekularen Substanzen die Verwendung von möglichst schonenden Säulenmaterialien, Lösungs- und Elutionsmitteln von ausschlaggebender Bedeutung.

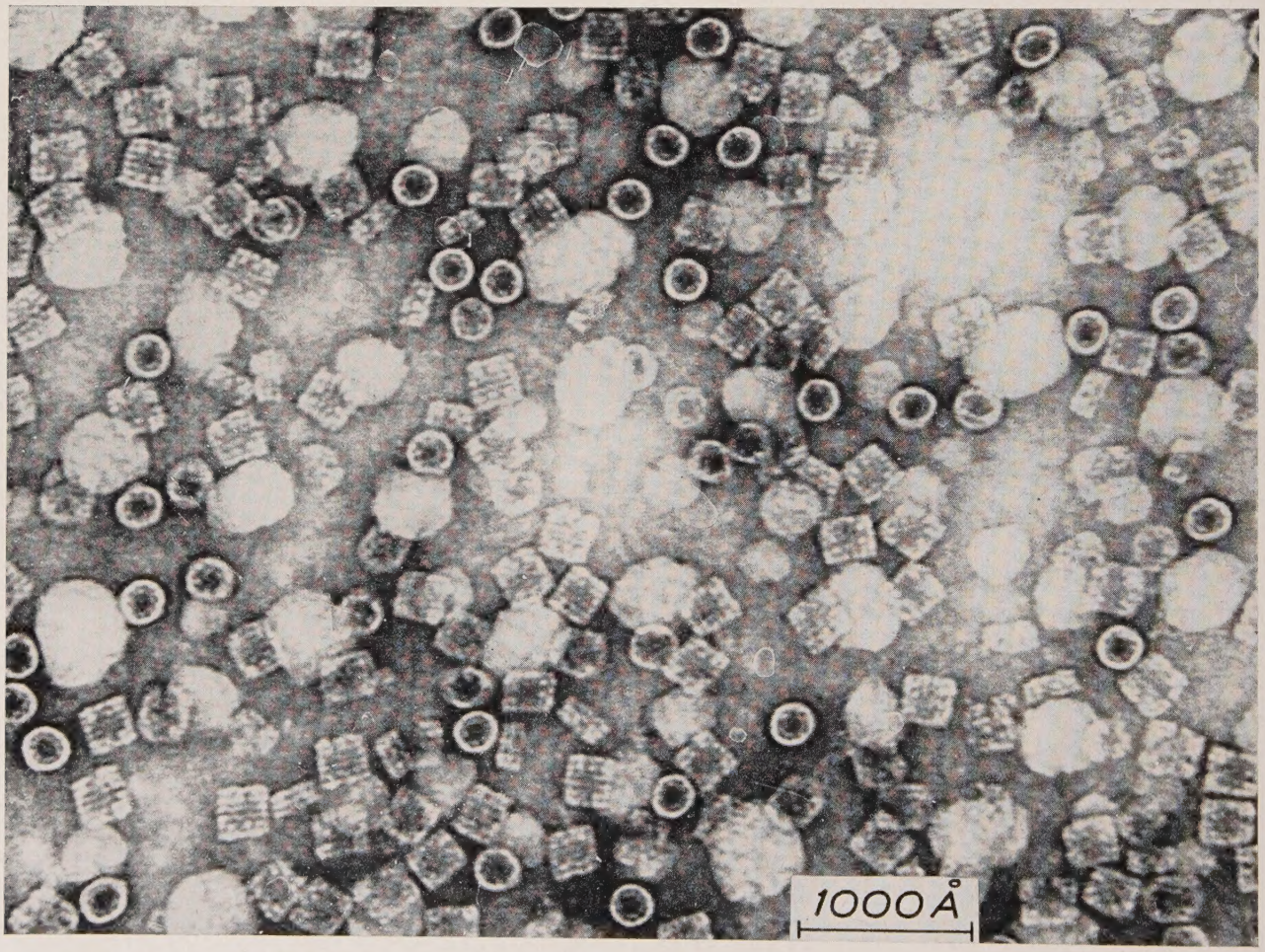


Fig. 1. Elektronenmikroskopische Aufnahme von Hämozyanin-Molekülen (*Helix pomatia*). Siemens Elektronenmikroskop. (LEVIN, Biochem. Institut, Uppsala. Siehe auch E. F. J. VAN BRUGGEN, E. H. WIEBENGA und M. GRUBER, Biochim. biophys. Acta *42*, 171 (1960)).

Man hat hier jetzt ziemlich grosse Fortschritte gemacht, und es ist sehr befriedigend, feststellen zu können, dass die ausgeprägte Spezifität der chromatographischen und Verteilungsmethoden auch für hochmolekulare Substanzen charakteristisch zu sein scheint.

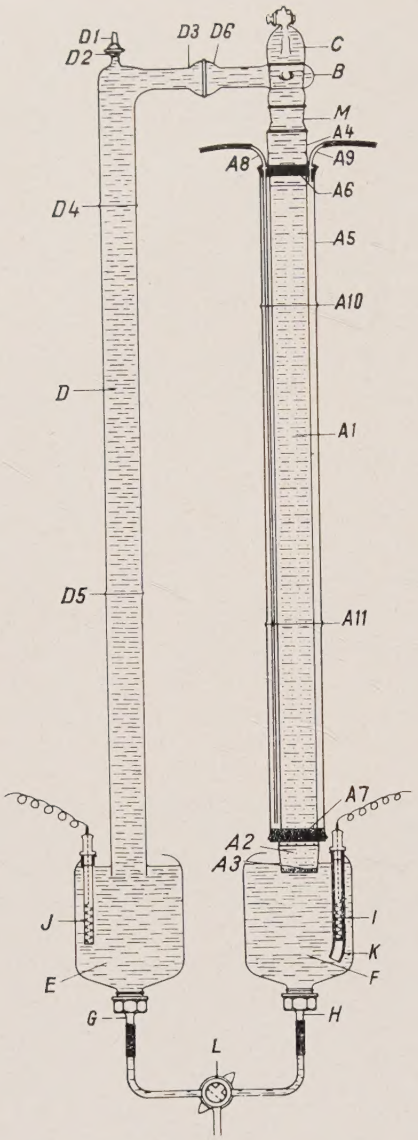
Elektrophorese. Die ursprüngliche Methodik der Elektrophorese, bei der die Wanderung der Grenzflächen in einem U-Rohr optisch verfolgt wird, bewährt sich noch gut für exakte quantitative Messungen, wobei die Komponenten eines Gemisches durch Bestimmung der Beweglichkeit charakterisiert werden. Für reine Trennungszwecke, bei denen quantitative Gesichtspunkte weniger wichtig sind, und auch im Mikro-Maßstab ist diese Ausführungsform weniger anwendbar, hier sind die sogenannten zonenelektrophoretischen Methoden weit überlegen. Die Grenzflächen in einem U-Rohr stabilisieren sich selbst, die Zonen dagegen müssen durch besondere Trägermittel wie Zellulosepulver, Stärke, verschiedene gelartige Substanzen und dergleichen stabilisiert werden, oder aber man führt die Versuche in Filtrierpapierstreifen aus (Papierelektrophorese).

Der Vorteil dieser Verfahren besteht nicht nur darin, dass man vollständige Trennungen auch kleinster Substanzmengen erreichen kann; die stabilisierende Wirkung des Trägermittels ermöglicht auch die Verwendung sehr geringer Konzentrationen, und nur unter diesen Voraussetzungen ist das Studium von niedrigmolekularen Substanzen möglich. Bei der Grenzflächenmethode kann man derartig verdünnte Lösungen kaum verwenden; entsprechende Versuche hatten wenig Erfolg. Eine Voraussetzung ungestörter elektrophoretischer Wanderung ist nämlich, dass die zu unterscheidenden Substanzen selbst sehr wenig zur Leitfähigkeit des Mediums (Pufferlösung) beitragen, wie es ja bei hochmolekularen Substanzen der Fall ist. Andernfalls und besonders mit niedrigmolekularen Elektrolyten, entstehen leicht sogenannte «Grenzflächenanomalien», die sich unter anderem durch eine ausgeprägte Asymmetrie der Wanderung (Unterschiede zwischen den beiden Schenkeln des U-Rohrs) bemerkbar machen. Dabei kann die Trennung ganz verwischt werden. Die Vorteile der «Trägerelektrophorese» erkauft man indessen zu einem gewissen Preis, da die Wechselwirkung zwischen den wandernden Substanzen und dem Träger, besonders bei hochmolekularen Stoffen, oft Störungen verursacht («Schwänzung» durch Adsorption). Solche Effekte beobachtet man zum Beispiel bei der Papierelektrophorese, die sich im übrigen ausserordentlich bequem und einfach durchführen lässt. Deshalb ist es, besonders für quantitative Zwecke und auch für präparative Arbeiten mit grösseren Substanzmengen besser, Kolonnen oder Tröge zu verwenden, die bei der Auswahl eines geeigneten Füllmaterials grössere Freiheit gestatten. Diese Feststellung erscheint eigentlich recht trivial, aber der Erfolg dieser Verfahren hängt tatsächlich zum grössten Teil von der Wahl des Trägers ab. Zellulosepulver, das durch passende Vorbehandlung inaktiviert wurde (Äthanolyse, Formaldehydbehandlung), wird in meinen Laboratorien viel verwendet (Flodin und Kupke[1], Levin[2]). Auch «Pevikon» (ein Polyvinylacetat-Polyvinylchlorid-Copolymerisat) zeigt wenig Adsorption, besitzt aber eine wesentlich geringere Flüssigkeitskapazität als Zellulose. Auch gewisse Gele können mit Vorteil benutzt werden – ich komme noch darauf zurück.

Als Beispiel einer einfachen Apparatur für Zonenelektrophorese in Säulen gilt die Ausführung von Porath, Lindner und Jerstedt[3] (Figur 2). Figur 3 stellt das Versuchsergebnis mit einem Hypophysenextrakt dar – die Zonen wurden während des Versuches kontinuierlich eluiert. Diese Methode lässt sich auch im Mikromaßstab entwickeln; wegen ihrer schnellen Durchführbarkeit kann sie als analytische Mikromethode mit einer Kapazität, die ungefähr derjenigen der Papierelektrophorese entspricht, angewendet werden. Überhaupt scheint die Entwicklung der elektrophoretischen Methoden jetzt so weit fortgeschritten zu sein, dass sie eine allgemeinere Verwendung auch in der analytischen Chemie verdienen. Und zwar kommen nicht nur elektrisch geladene Substanzen in Frage, vielmehr können auch ungeladene Stoffe durch Komplexbildung elektrophoretisch «mobilisiert» werden, zum Beispiel Zucker und Oligosaccharide in Boratpufferlösungen.

Auch verschiedenartige Gele haben eine allgemeine Verbreitung als Trägersubstanzen bei verschiedenen Typen der Zonenelektrophorese gefunden. Stärkegele hoher Konzentration ermöglichen in gewissen Fällen eine sehr gute Auflösung (Smithies[4]), wodurch der Nachweis neuer, von genetischen Gesichtspunkten her besonders interessanter Globuline im Blutserum möglich gemacht wurde. Allerdings sind die Wanderungsbedingungen in derartigen Gelen ziemlich kompliziert. Wahrscheinlich handelt es sich um eine Kombination von elektrophoretischer Wanderung und Ultrafiltrierung durch die engen Poren der Gelstruktur. Ähnliche Effekte herrschen wohl auch bei Gelen aus Polyacrylamid vor, die in mancher Hinsicht als besonders vielversprechendes Medium für Elektrophoreseversuche erscheinen (Raymond und Weintraub[5], Hjertén[6]). Die sogenannte «Immunelektrophorese» von Grabar und Williams, die eine Kombination der Gelelektrophorese mit dem bekannten serologischen Präzipita-

[1] P. Flodin und D. W. Kupke, Biochim. biophys. Acta *21*, 368 (1956).
[2] Ö. Levin, unveröffentlicht. Siehe auch E. F. J. van Bruggen, E. H. Wiebenga und M. Gruber, Biochim. biophys. Acta *42*, 171 (1960).
[3] J. Porath, E. B. Lindner und S. Jerstedt, Nature *182*, 744 (1958).
[4] O. Smithies, Biochem. J. *61*, 629 (1955).
[5] S. Raymond und L. Weintraub, Science *130*, 711 (1959).
[6] S. Hjertén, Arkiv f. Kemi *13*, 151 (1958).



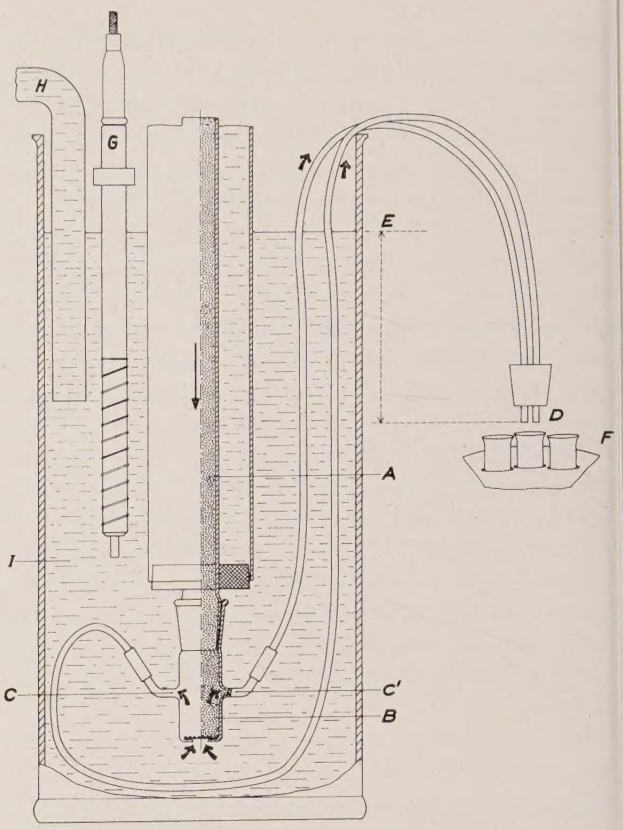


Fig. 2. Apparate zur Zonenelektrophorese in Säulen (nach PORATH et al.[3]). Die Säule rechts kann während des Versuches kontinuierlich eluiert werden.

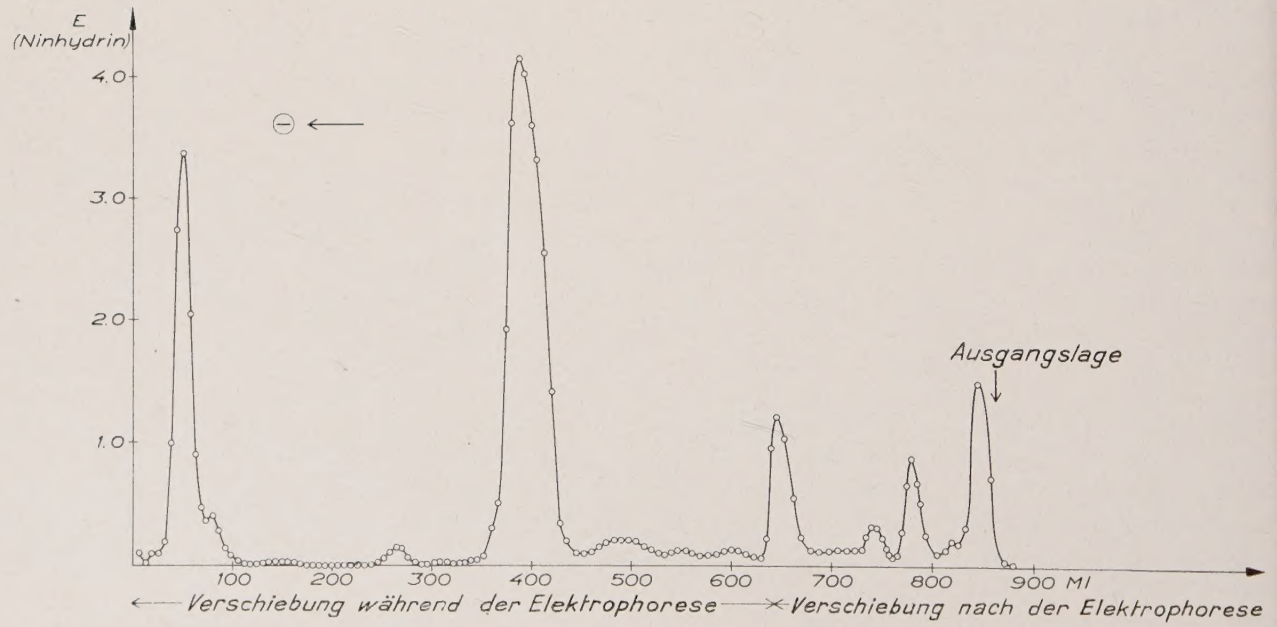


Fig. 3. Elutionsdiagramm eines Elektrophoreseversuches mit dem Apparat Fig. 2., rechts (Hypophysenextrakt).

tionsverfahren von OUDIN und OUCHTERLONY darstellt, hat grosse Bedeutung für die Identifizierung verschiedener Proteine in kompliziert zusammengesetzten Gemischen erlangt. Diese Versuche werden meistens in Agar-Gelen durchgeführt. Nach HJERTÉN[7] ist es vorteilhafter, aus dem Agar zuerst das Agaropektin zu entfernen und nur die reine Agarose zu benutzen, die weniger stark adsorbiert und sehr geringe Elektroosmoseeffekte aufweist (siehe auch BRISHAMMAR, HJERTÉN und v. HOFSTEN[8]). Es wäre natürlich sehr wertvoll, wenn man die Vorteile der freien Grenzflächenelektrophorese (ungestörte Wanderung, quantitative Beweglichkeitsmessungen) mit denen der Zonenelektrophorese (vollständige Trennung, geringerer Materialverbrauch) irgendwie vereinigen könnte. HJERTÉN hat einige Versuche in dieser Richtung gemacht. Figur 4 zeigt seinen Apparat für «freie Zonenelektrophorese». Das horizontale Elektrophoreserohr ist beweglich mit den Elektrodengefässen (links und rechts in der Figur) verbunden, so dass es langsam um seine Längsachse rotieren kann. Die Konvektion der Zonen im Elektrophoreserohr, die im ruhenden Rohr schnell einsetzt, wird durch die Rotation verhindert – es besteht ja offenbar keine bevorzugte Richtung für die konvektive Bewegung der schwereren Zonen. Wesentlich für den Erfolg beim Arbeiten mit diesem Apparat ist eine Vorbehandlung des Rohres mit einer Lösung von Methylzellulose. Dadurch eliminiert man die elektroosmotische Flüssigkeitsbewegung im Rohr, die sonst Anlass zu unübersehbaren Störungen gibt. Die Bewegung der Zonen kann man entweder optisch (im sichtbaren oder ultravioletten Bereich) beobachten oder registrieren, oder man kann die Flüssigkeitssäule nach erfolgter Trennung fraktionsweise sammeln und analysieren. Tatsächlich lassen sich mit diesem Apparat ebenso genaue Beweglichkeitsmessungen ausführen wie bei der freien Grenzflächenelektrophorese, aber mit viel kleineren Substanzmengen. In einem anderen Verfahren der freien Zonenelektrophorese benutzt man zur Stabilisierung der Zonen ein Dichtegradient von zum Beispiel konzentrierter Zuckerlösung (siehe SVENSSON und VALMET[9], SVENSSON[10]).

Methoden zur Trennung von mikroskopisch oder submikroskopisch kleinen Teilchen habe ich schon weiter oben als besonders wichtig bezeichnet. Von den bisher beschriebenen elektrophoretischen Verfahren eignet sich die freie Zonenelektrophorese nach HJERTÉN[6] besonders gut für solche Zwecke. Tatsächlich kann man in diesem Apparat Zellen, Bakterien und Zellfragmente elektrophoretisch sehr bequem trennen.

Bei den üblichen zonenelektrophoretischen Verfahren taucht oft die Schwierigkeit auf, dass die Wanderung grösserer Teilchen durch das Trägermedium (Pulver, Gel) mechanisch behindert wird. Wie HJERTÉN[6] gezeigt hat, kann man indessen in diesem Fall Säulen aus locker gepackten Gelsuspensionen, zum Beispiel Agar-Gel, verwenden, die hinreichend stabilisierend wirken, aber auch für grössere Partikel durchlässig sind. Diese Säulen zeigen beim Herauspressen der Suspension aus dem Elektrophoreserohr die interessante Eigenschaft des «plug flow», das heisst, das ganze Zonensystem bewegt sich ohne irgendwelche Verzerrung aus dem Rohr heraus, fast wie ein Festkörper. Dieser Umstand macht die Isolierung der getrennten Komponenten besonders bequem. Man kann derartige Säulen mit Vorteil allgemein bei elektrophoretischen Trennungen benutzen.

Es würde zu weit führen, in dieser hauptsächlich methodologischen Übersicht auf die mannigfaltigen Anwendungsmöglichkeiten elektrophoretischer Methoden einzugehen. Ich möchte nur kurz auf die überaus bedeutsamen Resultate hinweisen, die man neuerdings durch gut auflösende elektrophoretische Analyse besonders interessanter Systeme aus genetischer Sicht erhalten hat. Ich denke dabei vor allem an die zahlreichen Formen menschlicher Hämoglobine, die seit der Entdeckung des Sichelzellenhämoglobins durch PAULING, ITANO, SINGER und WELLS[11] aufgefunden wurden, und an die sehr interessanten Möglichkeiten, aus verwandten Hämoglobinen durch Dissoziation und Rekombination der Bruchstücke neue Hämoglobine herzustellen (siehe zum Beispiel ITANO und ROBINSON[12]).

Auch bei anderen Eiweisskörpern hat man neuerdings «Familien» verwandter Proteine beobachtet, die in einigen Fällen genetisch bedingt zu sein scheinen, in anderen offenbar Präparationsartefakte sind. Die schönen Elektrophoresediagramme aus Mikrosomenmaterial, die neulich WALLER und HARRIS[13] aus dem Laboratorium von TISSIÈRES veröffentlichten, geben

Fig. 4. Apparat zur freien Zonenelektrophorese nach HJERTÉN.

[7] S. HJERTÉN, erscheint demnächst. – S. HJERTÉN, erscheint demnächst (Biochim. Biophys. Acta). – S. HJERTÉN, erscheint demnächst.

[8] S. BRISHAMMAR, S. HJERTÉN und B. v. HOFSTEN, erscheint demnächst (Biochim. biophys. Acta).

[9] H. SVENSSON und E. VALMET, Science Tools *2*, 11 (1955) (LKB Produkter Ed., Stockholm).

[10] H. SVENSSON, in *A Laboratory Manual of Analytical Methods in Protein Chemistry, Including Polypeptides* (Ed. P. ALEXANDER and R. J. BLOCK, Pergamon Press, London 1960), vol. 1, p. 193.

[11] L. PAULING, H. A. ITANO, S. J. SINGER und I. C. WELLS, Science *110*, 543 (1949).

[12] H. A. ITANO und E. ROBINSON, Nature *183*, 1799 (1959).

[13] J. P. WALLER und J. I. HARRIS, Proc. Nat. Acad. Sci. (Washington) *47*, 18 (1961).

wichtige Auskünfte über die Zustände am Ort der Eiweissbiosynthese (Figur 5). Für die nächste Zeit erscheint die präparative Gestaltung dieser stark auflösenden elektrophoretischen Verfahren als eine besonders wesentliche Aufgabe mit dem Ziel, greifbare Mengen dieser Komponenten für ihre genauere chemische Untersuchung zu gewinnen.

Ich habe hier schon mehrmals auf die Wichtigkeit möglichst spezifischer und schonender Methoden zur Trennung biologischer Partikel hingewiesen und möchte jetzt auf einige Neuerungen in dieser Hinsicht näher eingehen.

Ultrazentrifugierung. Die Ultrazentrifugierung ist die eigentlich klassische Methode der Partikelfraktionierung; auch hier sind, wie bei der Elektrophorese, im Laufe der Zeit Zonenmethoden eingeführt worden, und zwar mit grossem Erfolg. Zur Stabilisierung benutzt man Gradienten, zum Beispiel Zuckerlösungen. Eine andere Möglichkeit wurde kürzlich von LEVIN[14] in meinem Laboratorium studiert. Es handelt sich dabei um die schon lange bekannten Schichtungserscheinungen, die man am Boden von Zentrifugenrohren manchmal beobachten kann (siehe auch CHAUVEAU et al.[15]). Diese Schichtung (Stratifikation) scheint nach LEVIN hauptsächlich auf einer gegenseitigen Verdrängung von Teilchenmaterial verschiedener Dichte zu beruhen. Unter dem Einfluss starker Schwerefelder werden die Dichteunterschiede vervielfacht, so dass die «archimedischen» Kräfte genügen, um auch in ziemlich zähen Materialien eine «Rangierung» entsprechend der Dichte herbeizuführen. Man erhält dadurch oft recht reine Zonen, und da die Methode auch bei beträchtlichen Materialmengen benutzt werden kann, dürfte sie für die preliminäre Aufarbeitung partikulärer biologischer Materialien, zum Beispiel Zellkomponenten, besonders nützlich sein. Figur 6 zeigt das Prinzip für eine solche Trennung.

Verteilungsmethoden. Die Verteilung von Substanzen zwischen zwei Phasen ist wohl die im Prinzip und in der Praxis einfachste Trennungsmethode der Chemie. Ihre Vervollkommnung als vielstufige Gegenstrommethode nach CRAIG hat der Chemie ein besonders wertvolles und empfindliches Verfahren gegeben, das eine vielseitige Anwendung in der Biochemie und organischen Chemie gefunden hat. Sonst sehr schwierige Analysen von Peptid- und Polypeptidgemischen lassen sich bekanntlich nach dem Craigschen Verfahren oft erfolgreich durchführen. Bei der Anwendung von Verteilungsmethoden auf hochmolekulare Substanzen – und noch mehr auf biologische Teilchen – stösst man indessen auf gewisse prinzipielle Schwierigkeiten. Selbstverständlich würde bei Eiweisskörpern zum Beispiel ein System Benzol/Wasser eine ganz einseitige Verteilung zugunsten der Wasserphase ergeben. Ausserdem würde wahrscheinlich an der Phasengrenze ein Teil des Eiweisses denaturiert werden. Offenbar setzt die erfolgreiche Anwendung der Verteilungsmethode in solchen Fällen einander ähnliche Phasen voraus: es lässt sich theoretisch ableiten (siehe zum Beispiel BRÖNSTED[16]), dass mit der Grösse der Moleküle oder Teilchen die Tendenz einer einseitigen Verteilung zunimmt und für eine wirksame Trennung die beiden Phasen bezüglich ihrer Zusammensetzung und Eigenschaften ähnlicher werden müssen.

Derartige Phasensysteme kann man zum Beispiel durch Aussalzen von Glycol-Wassermischungen herstellen, wobei sich eventuell die Verschiedenheiten zwischen den beiden Phasen durch andere Zusätze noch weiter ausgleichen lassen. Solche Systeme sind zur Trennung von Eiweissmischungen durch Gegenstromverteilung (s. TAVEL[17]) oder durch Verteilungschromatographie, zum Beispiel von MARTIN und PORTER[18], CRAIG und KING, YPHANTIS und CRAIG[19] benutzt worden, bieten aber doch gewisse Schwierigkeiten, die einer allgemeineren Verwendung im Wege stehen. Die Salzkonzentrationen sind hoch und die Systeme sehr temperaturempfindlich; die notwendigen Zusätze (zum Beispiel Trichloressigsäure) greifen unter Umständen empfindliche Substanzen an. Für biologische Partikel lassen sich diese Systeme nicht benutzen.

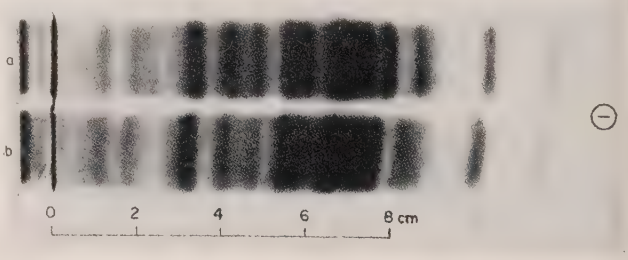


Fig. 5. Stärke–Gel–Elektrophorese von Eiweiss aus *E.-coli*-Mikrosomen in Gegenwart von 6 *M* Harnstoff. (a) ist Essigsäure-lösliches Eiweiss, (b) Ribosomenteilchen in 6 *M* Harnstoff gelöst. (Nach WALLER und HARRIS[18].)

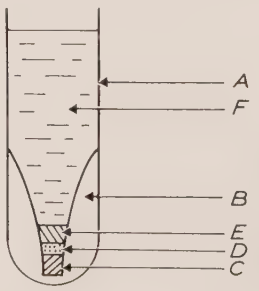


Fig. 6. Teilchentrennung durch Stratifikation in einem Ultrazentrifugesediment (LEVIN[2]).

[14] Ö. LEVIN, erscheint demnächst.
[15] J. CHAUVEAU, Y. MOULÉ und CH. ROUILLER, Exp. Cell Res. *11*, 317 (1956); Bull. Soc. Chim. biol. *39*, 1521 (1957).
[16] J. N. BRÖNSTED, Z. physiol. Chemie, Bodenstein-Festband, p. 257 (1931).
[17] P. TAVEL, Helv. chim. Acta *38*, 520 (1955).
[18] A. J. P. MARTIN und R. R. PORTER, Biochem. J. *49*, 215 (1951).
[19] T. P. KING, D. A. YPHANTIS und L. C. CRAIG, J. Amer. chem. Soc. *82*, 3350, 3355 (1960), und frühere Arbeiten.

Es ist das Verdienst P. Å. Albertssons in Uppsala (Schweden), Phasensysteme mit hochmolekularen Substanzen als phasenerzeugende Komponenten als wertvolle Hilfsmittel bei der Trennung von Teilchen verschiedener Art und Grösse sowie von Makromolekülen, besonders Eiweisskörpern, eingeführt zu haben. Er hat die optimalen Versuchsbedingungen für verschiedene derartige Phasensysteme und Substanzen festgestellt, unter anderem durch eingehendes Studium von Phasendiagrammen. In diesen Systemen stehen verschiedene Parameter zur Verfügung, durch deren Veränderung man die Trennungsbedingungen systematisch variieren kann, zum Beispiel die Art und Konzentration der vorhandenen Elektrolyte und das Molekulargewicht der phasenbildenden Substanzen. Die Salzkonzentration kann man gut im physiologischen Bereich halten; die Temperaturempfindlichkeit ist nicht gross, und – vor allem – greifen phasenerzeugende Komponenten wie Dextran, Methylzellulose, Polyäthylenglycol oder Polyvinylalkohol die meisten biologischen Systeme kaum an. Es gibt auf diesem Gebiet ausserordentlich vielseitige Anwendungsmöglichkeiten, die bisher das Hauptthema der Untersuchungen von Albertsson et al.[20] bildeten. Auch lassen sich wohl in nicht-wässerigen Lösungen, für die ähnliche hochpolymere phasenbildende Substanzen bekannt sind, verschiedene hochmolekulare Stoffe gut verteilen.

Ich möchte nun an Hand einiger Beispiele die Anwendungsmöglichkeiten dieses Verfahrens beleuchten.

In dem bereits erwähnten Dextran-Methylzellulose-Wassersystem verteilen sich niedrigmolekulare Substanzen, wie zum Beispiel gewöhnliche Salze, mit einem Verteilungskoeffizienten von 1,0. Das gleiche Verhalten zeigen annäherungsweise kleinere Eiweissmoleküle. Grössere Eiweissmoleküle, Nucleinsäuren, Viruskörper und Zellpartikel sammeln sich meist in der schwereren Phase (Dextran) an, wobei im allgemeinen gilt: Je grösser das Teilchengewicht, desto kleiner der Verteilungskoeffizient – wie aus der Tabelle hervorgeht.

Ähnliche Ergebnisse wurden mit dem System Dextran-Polyäthylenglycol-Wasser erhalten; dabei findet in manchen Fällen aber auch eine gut reproduzierbare und wohldefinierte Anreicherung an der Phasengrenzfläche statt, die ebenfalls für Trennungszwecke ausgenutzt werden kann. Sehr charakteristisch ist ausserdem bei diesen Systemen der starke Einfluss von Elektrolyten auf die Verteilung. Eine Substanz kann oft durch einfache Änderung der Salzkonzentration vollständig aus der einen Phase in die andere überführt werden, was für viele Trennungsoperationen von ausschlaggebender Bedeutung ist.

Ähnliche Erscheinungen beobachtet man in Dextransulfat-Polyäthylenglycol-Wassersystemen, die besonders bei der Reinigung von Viruskörpern benutzt wurden. Bei niedriger Konzentration an NaCl zum Beispiel sammeln sich die meisten Viren in der Bodenphase an, bei höherer in der oberen Phase. Tatsächlich kann man durch derartige Operationen auch aus sehr grossen Volumina eines Kulturmediums ohne Hilfe von Ultrazentrifugen verschiedene Viren konzentrieren und reinigen. Hierbei wählt man die Zusammensetzung des Phasensystems so, dass das Volumen der Phase dort, wo sich das Virus ansammelt, möglichst klein wird (etwa 1% des Gesamtvolumens).

Die Verwendung vielstufiger Operationen mit Hilfe der Craig-Technik liegt nahe, wenn man das Auflösungsvermögen steigern will, und ist tatsächlich auch bei biologischen Partikeln möglich. Allerdings benötigt man für eine vollständige Phasentrennung bei der Gegenstromverteilung bedeutend mehr Zeit als mit gewöhnlichen Systemen; man muss deshalb die Zahl der Überführungen einschränken, wenn nicht unbegrenzt Zeit zur Verfügung steht. Als Beispiel neuerer Untersuchungen auf diesem Gebiet siehe Figur 7 und 8 aus einer noch nicht veröffentlichten Arbeit von Albertsson, Baird und von Hofsten[21] über die Trennung von Bakterien durch Gegenstromextraktion in einem Zweiphasensystem aus 5% Dextran und 4% Polyäthylenglycol in Wasser.

Figur 7 zeigt die Verteilung (in % der Gesamtbakterienmenge) als Funktion der NaCl-Konzentration (in Mol) in einem einstufigen Versuch. Man erkennt zum Beispiel, dass die Verteilung von *E. coli* ML 3081 fast unabhängig von der Salzkonzentration ist, während der verwandte Coli-Stamm K 12 C (Hfr)[22] sich ganz anders verhält, ähnlich wie K 12 58/161 (Hfr). Die grösste Empfindlichkeit gegenüber Änderungen der Salzkonzentration liegt offenbar bei 0–0,02 *M* NaCl. Es sei aber hervorgehoben, dass sich in manchen Fällen ganz verschiedene Bakterien verteilungsmässig gleich-

Verteilungskoeffizient K und Teilchenoberfläche einiger Proteine und Viruskörper im System Dextran-Methylcellulose D 68–MC 4000.

Partikel	Oberfläche $(m\mu)^2 \times 10^{-3}$	K (M-Phase) (D-Phase)
Phykoerythrin	0,3	0,95
Hemocyanin, 1/8 Moleküle	0,86	0,65
Hemocyanin, 1/1 Moleküle	3,5	0,25
ECHO Virus	2,3	0,2
Polio-Virus	1,3	0,3
«Southern bean» mosaic Virus		0,41
Phage ØX 174		0,34
Phage T3	8,7	$2{,}1 \times 10^{-2}$
Tabakmosaik-Virus	14,4	$(1–2) \times 10^{-2}$
Phage T2	25,5	$(6–10) \times 10^{-4}$
Phage T4	25,5	$(3–5) \times 10^{-4}$
Vaccin-Virus	220	$(4–12) \times 10^{-5}$

[20] P. Å. Albertsson und E. Nyns, Nature *184*, 1465 (1959). – P. Å. Albertsson, *Partition of Cell Particles and Macromolecules*, Diss. (John Wiley and Sons, New York 1960).

[21] P. Å. Albertsson, G. D. Baird und B. v. Hofsten, erscheint demnächst (Nature).

[22] Hfr: männliche Typen mit hoher Rekombinationsfähigkeit.

artig verhalten. So ergeben zum Beispiel *E. coli* K 12-Stämme, 58/161 (Hfr), C 600 (F^-)[23] und auch *Bacillus megatherium* in diesem System Verteilungen, die sich nur wenig von *E. coli* K 12 C (Hfr) unterscheiden. Jedenfalls sind die Unterschiede oft genügend gross, um eine mehrstufige Gegenstromtrennung in der Craig-Apparatur durchführen zu können. Allerdings ist zu beachten, dass eigentlich *drei* Phasen vorliegen, da die Phasengrenzfläche als solche aktiv ist (Figur 7). Man muss deshalb dicht über oder unter dieser Grenzfläche «abschneiden», was ja leicht realisierbar ist. Ein besonders interessantes Beispiel einer solchen Verteilung gibt Figur 8, die die Trennung von (+)-Lactose- und (−)-Lactose-Kolonien von *E. coli* K 12 den Stämmen W 1177 (F^-) und 58/161 (Hfr) nach 45 Überführungen in einer Craig-Apparatur zeigt. In diesem Falle lassen sich also weibliche von männlichen Typen trennen, was bisher kaum möglich war.

Jedenfalls beweisen diese Versuche ebenso wie die erfolgreiche Anwendung der Verteilungsmethode auf Viren, dass wir hier ein sehr gut auswählendes Verfahren besitzen, um biologische Teilchen verschiedener Art trennen zu können. Dass die Methode ausserdem auch schonend ist, geht aus mehreren Versuchen hervor, in denen gezeigt wurde, dass nach der Behandlung Bakterien, Viren und auch zum Beispiel Zellen von Chlorella offenbar unbeschädigt fortleben und sich reproduzieren können.

Die Methode ist auch auf Eiweisskörper anwendbar. Bei mittleren und niedrigen Molekulargewichten sind die Unterschiede in den Verteilungskoeffizienten manchmal nicht sehr gross; sie genügen jedoch, um bei einer mehrstufigen Verteilung in der Craig-Apparatur gute Trennungen zu erreichen. Als Beispiel zeige ich Ihnen eine Trennung der beiden Algenproteine Phykoerytrin und Phykozyan (aus *Ceramium rubrum*, Figur 9). Bei ähnlichen Versuchen mit Enzymen blieb deren Aktivität erhalten. Diese Systeme verursachen also im allgemeinen keine Denaturierung. Es ist jedoch zweckmässig, alle Operationen im Kühlraum auszuführen.

Chromatographie. Die Chromatographie ist ebenfalls eine Methode, die ursprünglich vor allem für Substanzen niedrigen oder mittleren Molekulargewichts entwickelt wurde. Auch war früher die Anwendung hauptsächlich auf nicht-wässrige Lösungen beschränkt. Die heute so erfolgreiche Verwendung wässriger Lösungen bei Verteilungschromatographie (besonders auf Papier) und Ionenaustausch gelangte erst in der Zeit zwischen 1940 und 1950 zur vollen Entwicklung. Die Trennung auch hochmolekularer Substanzen mit Hilfe dieser einfachen und sehr spezifischen Methode erschien natürlich sehr verlockend, begegnete aber gewissen Schwierigkeiten, die erst in den letzten zehn Jahren teilweise überwunden wurden, zum Beispiel irreversible Adsorption am Säulenmaterial, langsame Gleichgewichtseinstellung und die Notwendig-

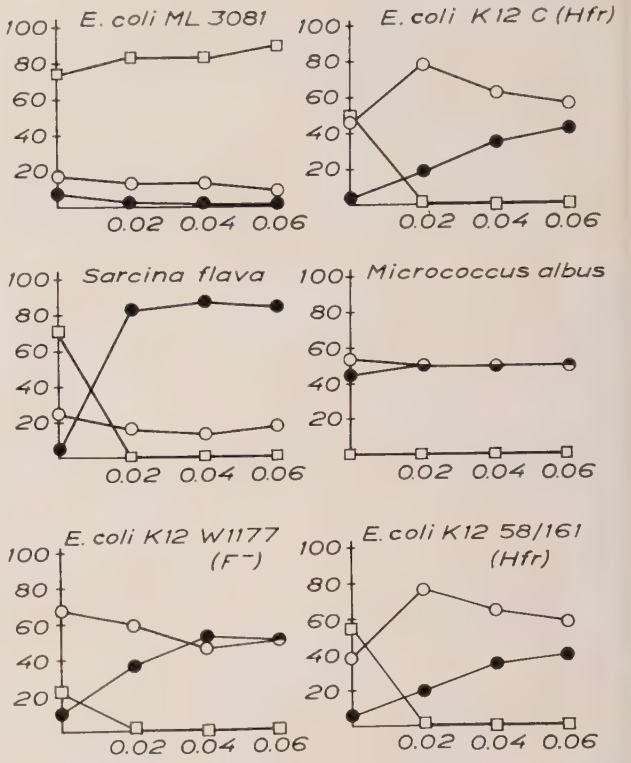


Fig. 7. Verteilungskurven für verschiedene Bakterientypen in einem Dextran-Polyetylenglykol-Wassersystem als Funktion der NaCl-Konzentraiton(M). ●—● Untere Phase. o—o Mittlere Phase (Phasengrenze). □—□ Obere Phase. (ALBERTSSON, BAIRD und v. HOFSTEN[21].)

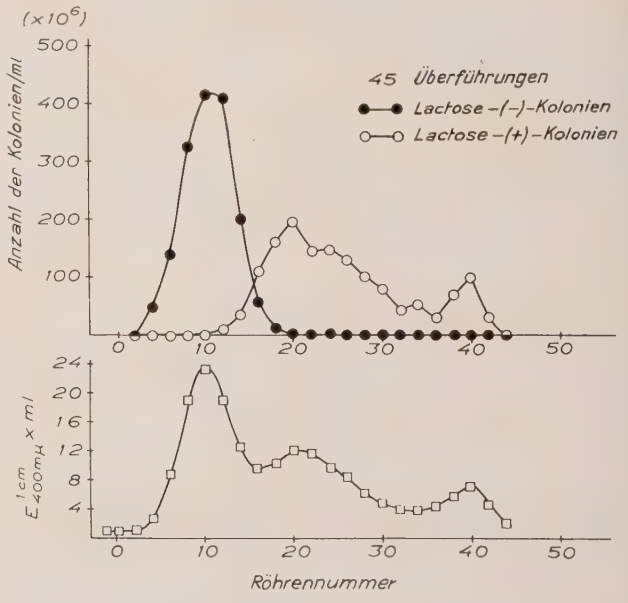


Fig. 8. Gegenstromverteilung nach 45 Überführungen von einer Mischung von *E. coli* K 12 Stämme W 1177 (F^-) und 58/161 (Hfr) in einem Dextran-Polyetylenglykol-Wassersystem (ohne Salz). Das obere Diagramm zeigt die individuelle Verteilung, das untere die Verteilung der Gesamtmenge (Lichtabsorption). (ALBERTSSON, BAIRD und v. HOFSTEN[21].)

[23] F^-: weibliche Standardtypen.

keit, sehr milde Elutionsmittel zu benutzen. Es stehen jetzt aber einige genügend schonende und selektive Adsorptionsmittel zur Verfügung, zum Beispiel die von SOBER und PETERSON[24] eingeführten Ionenaustauscher aus substituierter Zellulose (DEAE-Zellulose, ECTEOLA usw.) und die besonders von uns in Uppsala studierten Calciumphosphate 1 (Hydroxylapatite) (TISELIUS, HJERTÉN und LEVIN[25]), die wegen ihrer ganz andersartigen Affinitätsverhältnisse die Zelluloseaustauscher ergänzen. Die Eluierung wird bei allen diesen Säulen allgemein durch sukzessive Steigerung der Pufferkonzentration ausgeführt.

Da die meisten Eiweisskörper – wie die hochmolekularen Substanzen überhaupt – ziemlich kleine Elutionsintervalle besitzen, kann man sie nicht in einem konstant zusammengesetzten Medium eluieren, vielmehr muss man die Pufferkonzentration schrittweise oder kontinuierlich (in einem Gradienten) steigern. Dies hat den Nachteil, dass weniger übersichtliche Verhältnisse geschaffen werden; man kann zum Beispiel nicht die sogenannten Rf-Werte feststellen, vielmehr erfolgt die chromatographische Charakterisierung der einzelnen Komponenten durch die jeweilige Pufferkonzentration im Eluat. Es besteht die Gefahr, besonders bei der schrittweisen Eluierung, dass man «falsche Zonen» erhält, da ja eine Steigerung der Konzentration des Elutionsmittels eine Restelution teilweise zurückgehaltener Komponenten herbeiführen kann.

Wie überall in der Chromatographie kann man auch hier die Wahl optimaler Versuchsbedingungen für verschiedene Substanzen kaum rationell begründen. Bei den Zelluloseaustauschern herrscht wohl die elektrochemische Affinität vor, beim Calciumphosphat vielleicht auch die Affinität zum Calcium, in allen Fällen jedoch spielen sicher noch andere, bisher ungenügend bekannte Affinitätseffekte eine Rolle.

Durch die enge Zusammenarbeit zwischen FLODIN (Pharmacia, Uppsala) und PORATH[26] (in meinem Laboratorium) wurde in den letzten Jahren ein neues Säulenfüllmaterial für chromatographische Verfahren entwickelt (Sephadex), das für Trennungen von Substanzen mittleren Molekulargewichts (zum Beispiel Peptide und Polypeptide) wie auch von Eiweisskörpern nicht zu grossen Molekulargewichts besonders geeignet ist. Die vorher genannten Schwierigkeiten scheinen hiebei grösstenteils beseitigt zu sein. Der Trennungsvorgang beruht hauptsächlich auf der verschiedenen Grösse der Moleküle. Das zugrundeliegende Phänomen, zuerst von LATHE und RUTHVEN[27] für Trennungen benutzt, ist offenbar nicht eine Affinität zum Füllmaterial, sondern eher eine Art Ultrafiltrationseffekt, daher kann man die Methode als «Molekülsiebung» bezeichnen. Sie wird in der Literatur allgemein als Gel-Filtrierung beschrieben.

Sephadex ist ein feinkörniges Material, das durch dreidimensionale Vernetzung von Dextranmolekülen hergestellt wird. Die Körnchen zeigen in Wasser starkes, aber räumlich begrenztes Quellungsvermögen; das Material ist also unlöslich, ausserdem sehr stabil gegenüber ziemlich stark alkalischen und sauren Lösungen. Der Trennungsvorgang in einer Sephadex-Säule ist in Figur 10 schematisch dargestellt. Beim Passieren der Säule werden die kleineren Moleküle tiefer in die Gelkörnchen hineindiffundieren als die grösseren; daher werden sie in ihrer Bewegung durch die Säule hindurch verzögert. Infolge der kleinen Abmessungen der Körnchen geschieht ein solcher Austausch sehr schnell, und im Eluat erhält man nach der Molekülgrösse getrennte Zonen. Die Filtriergeschwindigkeit ist im allgemeinen sehr viel grösser als bei der gewöhnlichen Chromatographie, und die Ausbeuten sind fast quantitativ. Da die Affinitäten meist geringfügig sind, kann man die Säule durch einfaches Waschen mit Wasser regenerieren. Die Methode eignet sich deshalb auch gut für Arbeiten in grossem Maßstab, eventuell mit mehreren unmittelbar aufeinander folgenden Einzelansätzen. Besonders wesentlich ist im Hinblick auf das vorher Gesagte, dass hiebei die Eluierung in konstant zusammengesetztem Medium erfolgt, was die Feststellung der Rf-Werte und besonders effektive Trennungen erlaubt.

Sephadex ist jetzt in drei verschiedenen Permeabilitätsklassen zugänglich (G 25, G 50, G 75), die sich für

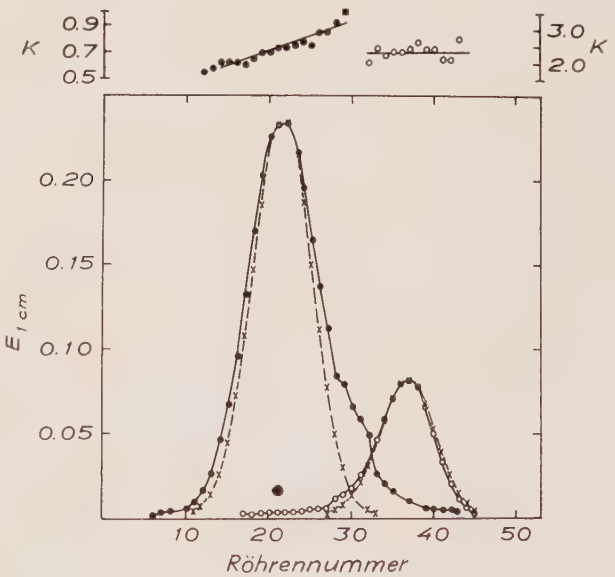


Fig. 9. Gegenstromverteilung von Phykoerythrin und Phykozyan in einem System Dextran-Polyetylenglykol-Wasser nach 53 Überführungen. Elektrolytgehalt 0,005 *M* KH_2PO_4, 0,005 *M* + K_2HPO_4 + 0,75 *M* KCl. Ordinate: Extinktion in der oberen Phase. Abszisse: Rohr-Nummer. Das Diagramm ganz oben zeigt die direkt bestimmten Verteilungskoeffizienten K für das Material in den einzelnen Rohren. (Nach ALBERTSSON und NYNS[20].)

[24] H. A. SOBER und E. A. PETERSON, J. Amer. chem. Soc. *76*, 1711 (1954).
[25] A. TISELIUS, S. HJERTÉN und Ö. LEVIN, Arch. Biochem. Biophys. *65*, 131 (1956).
[26] J. PORATH und P. FLODIN, Nature *183*, 1657 (1959).
[27] G. H. LATHE und C. R. J. RUTHVEN, Biochem. J. *62*, 695 (1956).

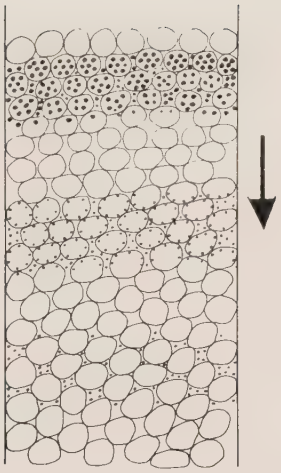


Fig. 10. Trennung durch Gelfiltrierung (schematisch).

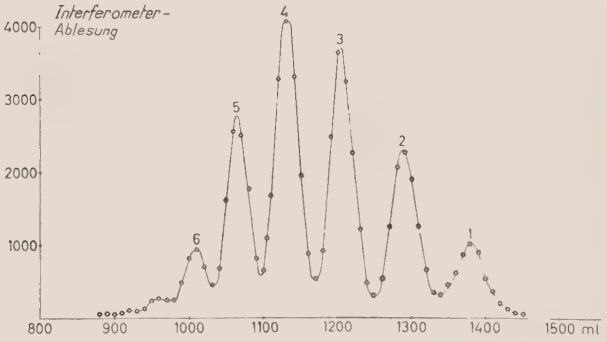


Fig. 11. Trennung eines 10%-Azetolysats von Cellulose durch Gelfiltrierung auf einer Säule von Sephadex (4,5 × 126 cm). Die Gipfel entsprechen (von links nach rechts) Cellohexaose, -pentaose, -tetraose, -triose, -biose und -glukose (nach Flodin, unveröffentlicht).

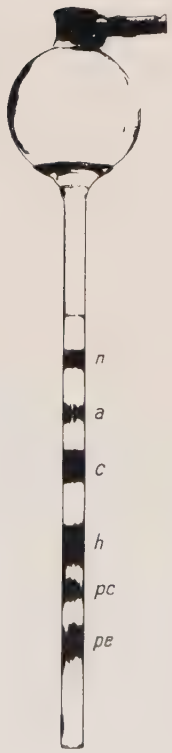


Fig. 12. Trennung durch Gelfiltrierung auf einer Säule aus vernetztem Polyacrylamid. Die Zonen sind Phykoerytrin (pe), Phykozyan (pc), Hämoglobin (h), Cytochrom C (c), DNP-Asparaginsäure (a) und Naphtolgrün (n). Die Rf-Werte sind approximativ 0,90, 0,78, 0,64, 0,40, 0,24 und 0,10 (nach Hjertén und Mosbach[29]).

Molekulargewichte von 0–2000, 1000–10000 oder 10000–40000 eignen. Die Methode hat schnelle Verbreitung gefunden, und die diesbezügliche Literatur ist bereits recht umfangreich[28]. Als Beispiel diene eine Trennung von verschiedenen Oligosacchariden, die durch Abbau von Zellulose erhalten wurden (Figur 11). Bei der Fraktionierung von Polypeptiden (zum Beispiel Hypophysenhormonen), überhaupt als erster Schritt bei der Aufarbeitung biologischer Extrakte, hat sich die Methode als besonders wertvoll erwiesen. Von grosser Bedeutung ist die – vielleicht etwas trivial anmutende – Anwendung bei der Entsalzung von Polypeptidlösungen und dergleichen in Fällen, bei denen keine Dialyse in Frage kommt, die Sephadex-Säule aber in einem einfachen Filtriervorgang eine vollständige Trennung gestattet. Die Methode wird jetzt in verschiedener Hinsicht weiterentwickelt. Man stellt nun zum Beispiel auch Ionenaustauscher auf Sephadex-Basis her, die besonders schnelle Trennungen mit grosser Kapazität und guter Ausbeute ermöglichen.

Die Frage, ob auch grössere Moleküle durch Gelfiltration getrennt werden können, wird augenblicklich näher untersucht. Kürzlich haben Hjertén und Mosbach[29] in meinem Institut Versuche in dieser Richtung mit Gelen aus Polyacrylamid erfolgversprechend durchgeführt. Diese Gele können mit verschiedenen Vernetzungsgraden hergestellt werden und eignen sich offensichtlich gut sowohl für niedrig- als auch für hochmolekulare Stoffe. Auch hier eluiert man bei konstanter Konzentration. Figur 12 zeigt eine derartige Säule aus Polyacrylamid-Gel; in diesem Versuch wurde in einem Schritt (Elution mit Natriumphosphat-Puffer 0,05 *M* pH 7,3) eine Trennung von Naphtholgrün (n) (MG 253), DNP-Asparaginsäure (a) (MG 285), Cytochrom c (c) (MG 13000), Hämoglobin (h) (MG 68000), R-Phykocyan (pc) (MG 135000 bei pH 7,5) und Phykoerythrin (pe) (MG 290000) ausgeführt. Die Säule hatte die Abmessungen 1,5 × 32 cm; die Elution nahm 10 h in Anspruch.

In dieser Übersicht habe ich mich hauptsächlich mit methodologischen Problemstellungen aus meinen eigenen Laboratorien beschäftigt. Ich hoffe jedoch, dass nicht der Eindruck gewonnen wird, dass wir uns in Uppsala nur für Fragen der Methodik interessieren. Im Gegenteil – ich glaube, es ist ein Hauptanliegen unseres Forschungsprogramms, die fruchtbare Verknüpfung von methodologischer und eigentlicher Problemforschung, bei der die Methoden zur Anwendung gelangen und zur Erzielung von Fortschritten unentbehrlich sind, zu vertiefen. Die Lösung vieler aktueller biochemischer Probleme hängt vom methodischen Fortschritt ab, der zwar manchmal mit sehr einfachen Mitteln, aber immer nur mit viel Probieren und Experimentieren erreicht werden kann.

[28] Ein vollständiges Literaturverzeichnis ist bei PHARMACIA LTD., Uppsala (Schweden) erhältlich.

[29] S. Hjertén und R. Mosbach, erscheint demnächst.

Summary. A survey is given of some recent progress, particularly in the author's own laboratory, of methods for the separation of macromolecules and particles of biological origin, as viruses, bacteriophage, microsomes, cell fragments, bacteria and whole cells. Special attention is given to recent developments in zone electrophoresis, protein chromatography, gel filtration and the new partition methods for separation of particles and macromolecules (ALBERTSSON). A number of examples are given to illustrate the various applications. Special emphasis is laid upon the new possibilities for biochemical-genetic studies by application of high-resolution separation methods, and the significance of particle separation methods as applied to fragments of biological structures in providing a tool for structure investigations on a macromolecular level—a field which also should be of considerable interest from a chemical point of view.

Brèves communications – Kurze Mitteilungen – Brevi comunicazioni – Brief Reports

Les auteurs sont seuls responsables des opinions exprimées dans ces communications. – Für die kurzen Mitteilungen ist ausschliesslich der Autor verantwortlich. – Per le brevi comunicazioni è responsabile solo l'autore. – The editors do not hold themselves responsible for the opinions expressed by their correspondents.

Über die Basizität der Knochenmineralien

Ausgehend von Untersuchungen über die Löslichkeit der Calciumphosphate sind wir zur Feststellung gelangt, dass Knochenmineralien stark basischen Charakter haben. Dies ist bisher wohl nicht zuletzt deswegen übersehen worden, weil bei experimentellen Untersuchungen die Calciumphosphate des Knochens meistens wie andere schwerlösliche, jedoch nicht oder kaum basische Calciumsalze z. zum Beispiel Calciumoxalat, Calciumphytat, Calciumfluorid) in verdünnten Mineralsäuren gelöst werden. Durch das saure Milieu wird der basische Charakter der Knochensalze dann sozusagen überdeckt.

Man kann nun schwerlösliche Calciumsalze statt durch Säuren (Verkleinerung der Anionenkonzentration im Ionenprodukt) auch durch Chelatbildner in Lösung bringen (Verkleinerung der Kationenkonzentration im Ionenprodukt). Wird hierbei ein vollständig dissoziierter Chelatbildner verwendet, bewirkt der mehr oder weniger stark basische Charakter des in Lösung gehenden Calciumsalzes, der durch das Anion determiniert wird, dass das pH der Lösung sich mehr oder weniger stark nach alkalisch verschiebt.

Geeignet für derartige Versuche ist Zitrat. So gehen die Calciumsalze von pulverisierter, nativer Knochenkompakta in 0,01–0,05 *M* wässerigem Natriumzitrat praktisch vollständig in Lösung. Die gelösten Basenaequivalente können dann nach Wegzentrifugierung der in Suspension bleibenden Partikel von kollagenem Material ohne weiteres mit verdünnter Mineralsäure titriert werden. Dabei ist zu berücksichtigen, dass bei mehrstufig dissoziierten Basen wie Phosphat und Carbonat das Resultat davon abhängt, bis zu welchem willkürlich festgelegten pH titriert wird. Es erscheint zweckmässig, zur Lösung der Knochensalze von einer auf pH 7,4 eingestellten Zitratlösung auszugehen und bei der Basentitration eingestellte Säure bis zur Erreichung dieses Ausgangs-pH zuzugeben. Dadurch werden – wie bei einer Osteolyse *in vivo* – die physiologisch unmittelbar verwerteten Basenaequivalente bestimmt. Unter Verwendung von tertiärem Calciumphosphat als Beispiel eines chemisch definierten schwerlöslichen Calciumsalzes kann das experimentelle Vorgehen wie folgt formuliert werden, wobei lediglich die Tatsache, dass bei Wahl des Endpunkts bei pH 7,4 ein kleiner Teil von HPO_4^{--} bis zur Stufe des $H_2PO_4^-$ neutralisiert wird, unberücksichtigt bleibt:

$$Ca_3(PO_4)_2 + 3\ Zit^{---} \rightarrow 3\ CaZit^- + 2\ PO_4^{---}$$

$$2\ PO_4^{---} + 2\ H^+ \rightarrow 2\ HPO_4^{--}$$

In der Tabelle I sind die Ergebnisse von Versuchen mit nativem Knochengewebe des Menschen und des Rindes wiedergegeben. Als Bezugsgrösse der Basenaequivalente wird die Totalkonzentration des gelösten Calciums verwendet (Base-Calcium-Quotient = B/Ca). Da Kontrollversuche ergeben, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen 95–100% des Knochenkalks in Lösung gehen, kann der ermittelte B/Ca-Wert als repräsentativ für die Knochenmineralien *in toto* gelten. Die Versuchsergebnisse zeigen also, dass bei der Mobilisation von 1 m *M* Knochencalcium gleichzeitig 0,8 m Aeq Base frei werden.

Aus zahlreichen älteren und neueren Arbeiten über den Mineralstoffwechsel ist ersichtlich, dass bei jeder metabolischen Azidose Knochenmineralien mobilisiert werden (RAAFLAUB[1]). Eine adaequate Interpretation dieser experimentell regelmässig reproduzierbaren Tatsache ist jedoch bisher nicht gegeben worden. Erst die zahlenmässige Erfassung des eminent basischen Charakters der Knochenmineralien führt nun zwanglos zu den physiologischen Zusammenhängen. Die Mobilisierbarkeit von Knochenbase stellt offensichtlich ein wesentliches Glied eines physiologischen Regulationsmechanismus zur Wahrung der pH-Konstanz des «milieu intérieur», bzw. zur Regenerierung der Alkalireserve des Blutes dar. Eine eingehende Erörte-

Tab. I. Bestimmung des Base-Calcium-Quotienten von nativem Knochenmineral, bezogen auf pH 7,40 (Interpretation siehe Text)

	Knochenpulver pro Ansatz	Gelöste Base (mAeq/l)	Gelöstes Calcium (m*M*/l)	Base-Calcium-Quotient B/Ca
Rippe Mensch	4 mg	0,84	1,05	0,80
Femur Rind	4 mg	0,94	1,15	0,82

[1] J. RAAFLAUB, Schweiz. Med. Wschr., im Druck.

rung dieses Regulationsmechanismus, das heisst der Beziehungen zwischen Knochensystem, Nebenschilddrüsenfunktion und Säure-Base-Haushalt wird an anderer Stelle erfolgen[1]. Hier sollen lediglich zwei mehr chemische Aspekte der Versuchsergebnisse hervorgehoben werden.

Bemerkenswert ist zunächst die grosse Menge der im Knochensystem eines Vertebraten vorhandenen Base. Man kann schätzen, dass eine generalisierte Demineralisation von etwa 30% noch mit einer ungestörten Funktion der Skelettmechanik vereinbar ist[2]. Ausgehend von dieser Annahme lässt sich berechnen, dass in den Knochen eines normalen menschlichen Organismus eine Basenreserve von ungefähr 8 Aequivalentgewichten verfügbar ist. Vergleicht man dagegen die Gesamtmenge der in Blut und Extrazellulärflüssigkeit gelösten Alkalireserve, die ungefähr 0,3 Aequivalentgewichte beträgt, tritt die rein mengenmässige Bedeutung der Knochenbase besonders klar hervor.

Bemerkenswert ist weiterhin, dass der Base-Calcium-Quotient des nativen Knochens gut mit den Sollwerten des tertiären Phosphates und des Carbonatapatits übereinstimmt, bzw. deutlich unter dem Sollwert des Hydroxylapatits liegt (Tabelle II). Dies widerspricht der üblichen, Auffassung, wonach das anorganische Material des Knochens zur Hauptsache aus Hydroxylapatit bestehen soll[3,4]. Gegen Carbonatapatit und eher für tertiäres Phosphat spricht die gute Zitratlöslichkeit des Knochenkalks. Die Zitratunlöslichkeit der Apatite wird ja geradezu zur Unterscheidung dieser Phosphate von anderen schwerlöslichen Calciumphosphaten verwendet[5]. Es soll und kann jedoch auf Grund unserer Versuchsergebnisse auf die noch offenen Fragen nach der kristallchemischen Struktur der nativen Knochenmineralien nicht weiter eingegangen werden.

Tab. II. Berechnete Base-Calcium-Quotienten (B/Ca) verschiedener schwerlöslicher Calciumsalze, bezogen auf pH 7,40.

	B/Ca
CaC_2O_4 , CaF_2 u. a.	0
$CaHPO_4 \cdot 2\,H_2O$	0,20
$Ca_4H(PO_4)_3 \cdot 2\,H_2O$	0,65
$Ca_3(PO_4)_2$	0,80
$Ca_{10}(PO_4)_6CO_3$	0,82
$Ca_5(PO_4)_3OH$	0,92
$CaCO_3$	1,05

Methodik. Kompaktagewebe von nativem Knoch wird mit einer Feile fein gepulvert. Je 4 mg Knochenpul werden mit 20 cm³ Na-Zitrat 0,05 *M*, eingestellt auf 7,4, während 24 h unter Luftabschlussschü gettelt. D nicht gelöste kollagene Material wird abzentrifugiert, Überstehende weiterverarbeitet.

Basenaequivalente: Titration eines aliquioten Teils Überstehenden mit 0,005 N H_2SO_4 bis pH 7,4 ± 0, (Endpunkt potentiometrisch mit Glaselektrode bestimm

Calcium: Das Totalcalcium eines aliquoten Teils Überstehenden wird mit Sulkowitsch Reagens als Oxa gefällt und abzentrifugiert. Nach Auflösen des Sedimen mit verdünnter Säure wird in üblicher Weise komplex metrisch titriert[6].

Die Base- und Calciumkonzentrationswerte der Tabell sind gemittelte Werte von je 2 Parallelanalysen, der Einzelwerte bis ±2% vom eingetragenen Mittel differ ren können.

Summary. The inorganic salts of bone tissue are, owi mainly to their contents of tertiary phosphate, strong basic. A quantitative evaluation of these base equivaler can be performed through simple titration with acid af solution of the bone salts in a chelating agent (e.g. citrat Referring to an endpoint of pH 7.40, one finds that p mMol Calcium 0.82 mEq base is set free. With rega to acid-base metabolism, the results indicate that bo phosphate, which *in vivo* can be mobilised through oste clastic resorption, forms a remarkably big base reserve the animal organism.

J. RAAFLAU

Pharmakologisches Institut der Universität Bern (Schwei 29. Juni 1961.

[2] Eine 30%ige Entkalkung des Skeletts entspricht einer röntge logisch eben erkennbaren Osteoporose. Siehe hierzu L. BABAIA Radiol. Clinica (Basel) *16*, 291 (1947).

[3] D. CARLSTRÖM und A. ENGSTRÖM, *The Biochemistry and Phys logy of Bone* (Ed. by G. BOURNE, Acad. Press Inc., New York 19 p. 149.

[4] E. SCHÜTTE, in *Chemie und Stoffwechsel von Binde- und Knoch gewebe* (Springer Verlag, Berlin 1956).

[5] E. HAYEK und H. NEWESELY, Monatshefte für Chemie *89*, (1958).

[6] G. SCHWARZENBACH, *Komplexometrische Titration* (F. Enke Verla Stuttgart 1956).

[7] Die vorliegende Arbeit wurde mit der Unterstützung des Schwe Nationalfonds zur Förderung der wissenschaftlichen Forschu durchgeführt.

Beobachtung eines reversiblen Komproportionierungseffektes unter Lichteinwirkung bei Chrom-tris-2,2′-dipyridyl-Komplexen

Bei der Arbeitsweise des von HERZOG[1] für die Darstellung von Chrom(0)-tris-2,2′-dipyridyl gewählten Verfahrens entstehen in der wässrigen Lösung bei pH 7 suspendiertes $(CrDipy_3)^0$, gelöstes $(CrDipy_3)^{2+}$ [2], gelöstes $(CrDipy_3)^{3+}$ und Acetationen.

Wie wir fanden, verfärbten sich die an der Gefässwand haftenden roten Tropfen unter Lichteinwirkung (Sonnenlicht oder UV) blau. Die blaue Farbe geht in der Dunkelheit wieder in die ursprüngliche rote über.

Da in der Reihe der Chrom-tris-2,2′-dipyridyl-Komplexe verschiedener Wertigkeiten (0, 1, 2, 3) nur der Chrom(I)-tris-2,2′-dipyridyl-Komplex $(CrDipy_3)^+$ blau gefärbt ist und zudem mit fast allen Anionen wasserunlösliche Ver bindungen ergibt, scheint die folgende Deutung der Reak tion wahrscheinlich:

$$\underset{\text{rot susp.}}{(CrDipy_3)^0} + \underset{\text{rot gelöst}}{(CrDipy_3)^{2+}} \underset{\text{dunkel}}{\overset{h \cdot \nu}{\rightleftharpoons}} \underset{\text{blau susp.}}{2\,(CrDipy_3)^+}\ [3]$$

Diese Reaktion konnte beliebig oft mit derselben Sub stanz von links nach rechts und zurück ausgeführt werde

[1] S. HERZOG und K. C. RENNER, Chem. Ber. *92*, 872 (1959).

[2] G. A. BARBIERI und A. TETTAMANZI, C. R. Accad. Lincei [6ª], *15* 877 (1932).

[3] FR. HEIN und S. HERZOG, Z. anorg. allg. Chem. *267*, 337 (1952).

Zum Nachweis des unter Lichteinwirkung entstehenden $(CrDipy_3)^+$ wurden Proben dieser Substanz mit hochverdünnter Jodlösung sorgfältig unter Luftabschluss oxydiert, wobei die blaue Farbe des $(CrDipy_3)^+$ in die weinrote Farbe des $(CrDipy_3)^{2+}$ und mit einem weiteren Äquivalent in die gelbe Farbe des $(CrDipy_3)^{3+}$ überging:

$$\underset{\text{blau}}{(CrDipy_3)^+} \xrightarrow{\text{Oxydation}} \underset{\text{weinrot}}{(CrDipy_3)^{2+}} \xrightarrow{\text{Oxydation}} \underset{\text{gelb}}{(CrDipy_3)^{3+}}$$

Wir werden später an anderer Stelle genauere Einzelheiten berichten[4].

Summary. The effect of light and dark upon comproportionation and disproportionation respectively of chromium tris-bipyridine complexes is described.

U. P. Geiger und E. Class

Institut für Anorganische Chemie der Universität Basel, 20. Juli 1961.

[4] Herrn Prof. Dr. H. Erlenmeyer danken wir für seine Unterstützung und seine wertvollen Anregungen.

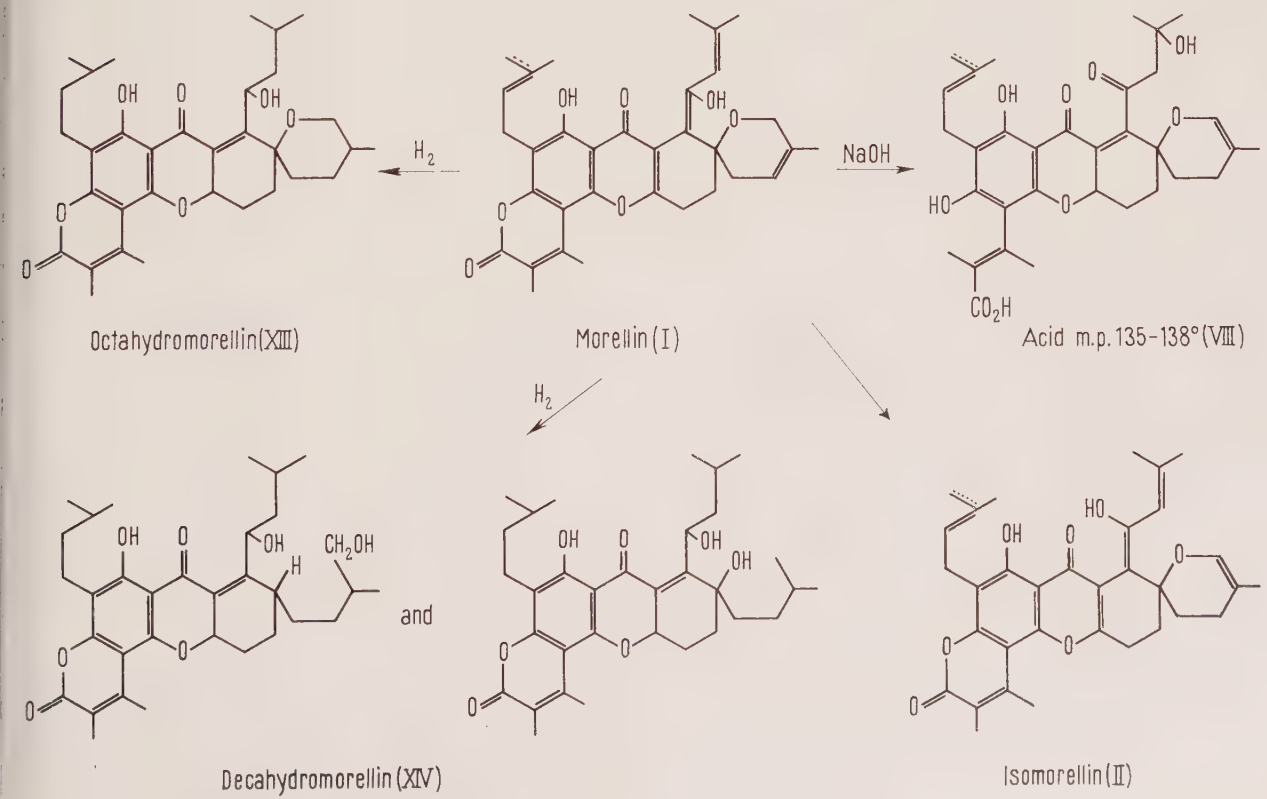
Structure of Morellin

Revision of the molecular formula[1,2] to $C_{33}H_{36-38}O_7$ favours modification of the structures suggested earlier[3] for morellin to (I) (Figure) in light of further experimental data.

Acid and alkali catalyzed (1% EtOH-H_2SO_4 at 25°, boiling 95% acetic acid, C_5H_5N, or 0.02 *N* EtOH-NaOH) conversion of morellin (I) to isomorellin $C_{33}H_{36}O_7$ (II) (red copper complex[4] $(C_{33}H_{36}O_7)_2Cu$, m.p. 224°; negative Gibb's test[5], cf. [2]) occurs with initial addition of the elements of water to an isopropylidine residue to form moreollin[6,7] $C_{33}H_{38}O_8$ (III) isomerizing to isomoreollin $C_{33}H_{38}O_8$ (IV) followed by their elimination which results in a new disposition of double bonds. Acetylation (boiling Ac_2O-C_5H_5N) of (I) to (IV) produces the same morellin diacetate $C_{37}H_{40}O_9$ (V). The isomeric change of morellin monomethyl ether $C_{34}H_{38}O_7$ (VI)[3] (positive ammonium phosphomolybdic acid and Dimroth tests, negative ferric reaction) to isomorellin methyl ether (VII)[2] is apparently similar, although the intermediate methyl ethers of (III) and (IV) have not been isolated. The lactone ring in (I) opens in contact with 2 *N* ethanolic NaOH for 18 h, and, with addition of another molecule of water, forms in a yield of 85% an *amorphous acid* $C_{33}H_{40}O_9$ (VIII) m.p. 135–138° (*methyl O-methylether* $C_{35}H_{44}O_9$ (IX) m.p. 90–92°) closely resembling α- and β-guttiferic acids[7].

Stepwise hydrogenation of (I) with Adam's catalyst leads to *dihydro-I* (X) m.p. 153–154°, *tetrahydro-I* (XI)

[1] S. C. L. Verma, Ph. D. Thesis, University of Bombay (Sept. 1954).
[2] N. V. Bringi, K. H. Shaw, and K. Venkataraman, J. sci. industr. Res. *14* [*B*], 135 (1955).
[3] P. L. Narasimha Rao, D. V. Krishna Murthy, and S. C. L. Verma, Naturwiss. *41*, 66 (1954).
[4] D. V. Krishna Murthy, Report to the Government of India (July 1956).
[5] F. E. King, J. J. King, and L. C. Manning, J. chem. Soc. *1957*, 563.
[6] D. V. Krishna Murthy and P. L. Narasimha Rao, J. sci. industr. Res. *12* [*B*], 565 (1953).
[7] K. V. Nageswara Rao and P. L. Narasimha Rao, Exper., *17*, 213, (1961).



m.p. 162–163°, *hexahydro-I* (XII) m.p. 158–159°, and *octahydromorellin* (XIII) m.p. 151–152°. Uptake of hydrogen by (I) in glacial acetic acid above 4 *M* is slow and indefinite but an amorphous *decahydromorellin* (XIV) could be recovered from the reaction product. A stable crystalline *decahydromorellin* (XV) m.p. 125–126° (cf. m.p. 110–111° given by BRINGI et al.[2]) different from (XIV) results by drastic reduction with Raney nickel in ethanol according to the method of MOZINGO et al.[8]. Treatment of (XIV) with nickel under similar conditions gives a *dodecahydromorellin* $C_{33}H_{48}O_7$ (XVI) m.p. 107°. Reduction of the *bromocompound* $C_{33}H_{45}O_6Br$ (XVII) m.p. 125–130° (decomposed) resulting from interaction of (XV) and PBr_3 yields a *deoxydecahydromorellin* $C_{33}H_{46}O_6$ (XVIII) m.p. 141–142° different from the deoxy *compound* $C_{32\text{-}33}H_{44\text{-}46}O_6$ (XIX) m.p. 174° formed on treatment of (I), (II), (XIII) or (XIV) with Raney nickel in boiling phenol or cyclohexanol. While (XIV), on alkaline permanganate oxidation, yields acetic (0.33 to 0.4 *M*), *iso*valeric (0.42 *M*) and *iso*caproic (0.48 *M*) acids and a volatile lactone $C_6H_{10}O_2$ (b.p. 90–95°/30–35 mm, 0.1 *M*) besides α-methylglutaric acid and other unidentified acids (XV) and (XVIII) form acetic (0.16 *M*) and *iso*caproic (0.46 *M*) acids and only traces of *iso*valeric acid but none of the volatile lactone. Formation of nearly 1 *M* of the combined *iso*caproic and *iso*valeric acids indicates the presence in (XIV) of two distinct aliphatic side chains in contrast to (XV), where the moiety yielding *iso*valeric acid has apparently rearranged during the MOZINGO treatment. An *acidic phe*[illegible] $C_{16}H_{22}O_4$ (XX) m.p. 159° (*dimethyl ether* $C_{18}H_{26}O_4$ (XX[illegible] m.p. 159°), isolated from products of alkali fusion of (XI[illegible] at 290° for 20 min, reacts with semicarbazide and perio[illegible] acid, and, on oxidation with alkaline permanganate, spl[illegible] into α-hydroxy-*iso*butyric acid. In addition to (XX), [illegible] second, neutral *phenol* $C_{24}H_{30}O_5$ (XXII) m.p. 161° resu[illegible] from (XV) on treatment with ethanolic KOH at 18[illegible] for 2 h.

Apart from their similar biological properties, the clo[illegible] structural relationship of morellin to guttiferins[7] is bor[illegible] out from the formula (I).

Zusammenfassung. In der vorliegenden Arbeit wird ei[illegible] neue Strukturformel (I) für Morellin vorgeschlagen, d[illegible] mit der Summenformel $C_{33}H_{36\text{-}38}O_7$ übereinstimmt. Neb[illegible] der strukturellen Ähnlichkeit zeigen auch biologisc[illegible] Eigenschaften des Morellins (I) dessen Verwandtscha[illegible] mit Guttiferin.

D. V. KRISHNA MURTHY and P. L. NARASIMHA RA[illegible]

Antibiotics Laboratory, Department of Biochemistry, Indic[illegible] Institute of Science, Bangalore (India), March 13, 1961.

[8] R. MOZINGO, C. SPENCER, and K. FOLKERS, J. Amer. chem. So[illegible] *66*, 1859 (1944).

Über den Einbau ^{14}C-markierter Aminosäuren in Zellkernfraktionen aus Meerschweinchenleberzellen *in vitro*

Wie schon früher berichtet wurde[1], besitzen isolierte Zellkerne aus der Thymusdrüse und Leber der Ratte die Fähigkeit, in Anwesenheit von Glucose radioaktive Aminosäuren in Proteine einzubauen. Dass Aminosäuren auch *in vitro* in verschiedene durch Desoxycholan und Lubrol erhaltene Zellkernfraktionen eingebaut werden, wurde unlängst von RENDI festgestellt[2].

In dieser Mitteilung berichten wir über den Einbau markierter Aminosäuren in einzelne Zellkernfraktionen, die nach Aufschliessung der Kerne durch fraktioniertes Zentrifugieren erhalten wurden. Der Einbau von ^{14}C-markierten Aminosäuren in diese Fraktionen wurde *in vitro* durchgeführt bei Verwendung intakter Zellkerne, ihrer Homogenate sowie isolierter Zellkernfraktionen. Die Darstellung der Zellkerne erfolgte nach HOGEBOOM et al.[3]. Das Verfahren verlangte zusätzlich ein 5 min langes Zentrifugieren bei 60 g, um die noch vorhandenen intakten Zellen zu entfernen. Das Zellkernpräparat liess mikroskopisch nicht mehr als 2–3% ganze Zellen erkennen.

Die Leberzellkerne wurden mit radioaktiven Aminosäuren, bei Zusatz von gepufferter Glucose als Energiequelle, inkubiert[1] und nach 30 min in einem Glashomogenisator bei 1500 U/min und 0° 4 min lang homogenisiert. Das Homogenat wurde nachher mit einer gekühlten Zentrifuge in 3 Fraktionen zerlegt. Die erste Fraktion bestand aus unzerstörten Zellen und grösseren Zellbestandteilen, die zweite aus im Mikroskop gut sichtbaren und bei 40000 *g* während 1,5 h sedimentierenden Partikeln. Die Analyse von Ribonucleinsäure (RNS)[4] und Eiweiss[5] in diesen Partikeln ergab ein Verhältnis (RNS zu Eiweiss) von 0,22. Weder durch Extraktion mit heisser Trichloressigsäure noch durch die Feulgensche Nuclealreaktion konnte die Anwesenheit von Desoxyribonucleinsäure nachgewiesen werden. Diese Zellkernteilchen nennen wi[illegible] Ribonukleoproteid-Partikel (RNP). Der Sedimentüber[illegible] stand stellte Fraktion 3 dar. Durch Resuspendierung d[illegible] zwei ersten Fraktionen in Wasser und Zufügen von Tr[illegible] chloressigsäure zu sämtlichen Fraktionen bis zum F[illegible] reichen einer Endkonzentration von 5% konnten die Pr[illegible] teine abgeschieden und nachher mit den üblichen M[illegible] thoden[6] gereinigt werden. Ihre Menge wurde bestimm[illegible] und die Radioaktivität in einer unendlich dünnen Schic[illegible] mit einem Geiger-Müller-Fensterzählrohr gemessen. D[illegible] erhaltenen Zahlenwerte sind in Tabelle I A aufgeführt.

Tab. I. Einbau ^{14}C-markierter Aminosäuren in Zellkernfraktione[illegible] aus intakten und zerstörten Zellkernen *in vitro*

Nr.	Fraktion	Impulse/h/mg Protein (A) Inkubierung intakter Kerne	(B) Inkubierun[illegible] zerstörter Ker[illegible]
1	Sediment bei 600 *g*	70	962
2	Sediment bei 40000 *g*	254	1973
3	Überstand	680	2753

1 ml der Inkubationsmischung hatte folgende Zusammensetzung[illegible] 0,5 ml einer Suspension von Zellkernen (intakte oder zerstörte) i[illegible] 0,25 *M* Rohrzuckerlösung, die aus 0,5 g Lebergewebe erhalten wurden[illegible] 0,25 ml 0,1 *M* Phosphatpuffer, pH 7,3 in 0,25 *M* Rohrzuckerlösung[illegible] 0,2 ml 0,1 *M* Glucose mit 0,75 mg NaCl, 0,05 ml ^{14}C-markierte Amino[illegible] säuren (0,675 μc). Inkubiert wurde 30 min bei 37° in offenen Reagenz[illegible] gläsern.

[1] V. G. ALLFREY, A. E. MIRSKY und S. OSAWA, J. gen. Physiol. *40*[illegible] 451 (1951).
[2] R. RENDI, Exp. Cell Res. *19*, 489 (1960).
[3] G. H. HOGEBOOM, W. C. SCHNEIDER und M. J. STRIEBICH, J. biol. Chem. *196*, 111 (1952).
[4] M. OGUR und G. ROSEN, Arch. Biochem. *25*, 262 (1950).
[5] O. H. LOWRY, N. J. ROSEBROUGH, A. L. FARR und R. J. RANDALL, J. biol. Chem. *193*, 265 (1951).
[6] J. L. SIMKIN und T. S. WORK, Biochem. J. *65*, 307 (1957).

Um festzustellen, inwiefern die Aminosäureeinbaufähigkeit in zerstörten Zellkernen erhalten bleibt, wurden die Zellkerne mechanisch aufgeschlossen und mit ^{14}C-markierten Aminosäuren und Glucose unter den obigen Bedingungen inkubiert, dann fraktioniert und die Radioaktivität der Proteinfraktionen gemessen. Die Messwerte sind in Tabelle IB zu sehen.

Wie aus Tabelle I zu ersehen ist, haben zerstörte Zellkerne unter den obigen Bedingungen ihre Fähigkeit, Aminosäuren einzubauen, nicht eingebüsst. Dieser Befund weist eindeutig auf das Intaktbleiben des glykolytischen Systems hin. Bemerkenswert ist auch die höhere Einbauintensität zerstörter Zellkerne im Vergleich mit den unbeschädigten Kernen. Diesen Befund konnte man mit der Entfernung einer Barriere, die wahrscheinlich die Zellkernmembran den Aminosäuren gegenüber darstellt, in Zusammenhang bringen. Die grösste Radioaktivität war in beiden Fällen in den RNP-Partikeln und im Überstehenden festzustellen.

Weiterhin wurde untersucht, inwiefern die Anwesenheit aller drei Zellkernfraktionen zur Proteinsynthese notwendig ist. Die RNP-Partikel wurden zusammen mit Glucose, markierten Aminosäuren und dem Zellkernüberstand inkubiert. Unter denselben Bedingungen wurde auch das Überstehende ohne die übrigen Fraktionen inkubiert. Die Messwerte sind in Tabelle II zu sehen.

Tab. II. Einbau ^{14}C-markierter Aminosäuren in die RNP-Partikel in Anwesenheit des Zellkernüberstandes und in den Zellkernüberstand allein

Fraktion	Impulse/min/mg Protein Inkubationszeit in min			
	1	10	20	40
RNP-Partikel	48	85	113	148
Zellkernüberstand	276	301	506	407

Zusammensetzung von 10 ml Inkubationsmischung: 1,5 ml in 0,1 *M* Phosphatpuffer, bei pH 7,3 suspendierte RNP-Partikel (11 mg Eiweiss), 5,4 ml Überstand (6,5 mg Eiweiss), 2,1 ml 0,1 *M* Glucose mit 7,9 mg NaCl, 1 ml ^{14}C-markierte Aminosäuren (13,5 μc). Dieselbe Zusammensetzung hatte auch der Zellkernüberstandansatz, jedoch ohne die RNP-Suspension. Inkubiert wurde bei 37° in offenen Reagenzgläsern. In den entnommenen Proben wurden die RNP-Partikel nach vorheriger dreimaliger Verdünnung mit 0,25 *M* Rohrzuckerlösung unter Zusatz von nicht-radioaktiven Aminosäuren abzentrifugiert.

Aus den erhaltenen Resultaten kann man schliessen, dass zum Einbau der Aminosäuren in Zellkernproteine nicht unbedingt sämtliche Zellkernbestandteile notwendig sind. Die Proteinsynthese in den RNP-Partikeln erfolgt schon in Anwesenheit des Zellkernüberstandes, welcher – wie weitere Versuche ergaben – mit dem cytoplasmatischen Überstand ersetzt werden kann. Wie aus Tabelle II zu ersehen ist, baut auch der Zellkernüberstand nach Entfernung der RNP-Partikel Aminosäuren mit grosser Intensität in die Proteine ein. Obwohl man diesen Einbau auch auf eine unvollkommene Abscheidung der RNP-Partikel zurückführen könnte, so weist doch die weitaus grössere Aktivität des Überstandes gegenüber der der RNP-Partikel auf einen engen Zusammenhang der Aktivität mit den löslichen Proteinen hin. Dieser Befund stimmt gut überein mit den Resultaten von Kalf und Simpson, anhand welcher der Überstand von zerstörten Mitochondrien nach achtstündigem Zentrifugieren bei 105000 *g* die Fähigkeit besass, radioaktives Valin im Verlauf von ein paar Stunden in Proteine einzubauen[7].

Unsere Versuche weisen darauf hin, dass die durch Zentrifugieren zerstörter Leberzellkerne erhaltenen RNP-Partikel fähig sind Aminosäuren in einem zellfreien System in Proteine einzubauen. Ausserdem deuten sie auch auf das Vorhandensein eines löslichen Systems in den Kernen hin, das fähig ist, die Proteinsynthese in Abwesenheit der Partikel durchzuführen.

Summary. The incorporation of ^{14}C-amino acids into ribonucleoproteid particles obtained by differential centrifugation of mechanically disintegrated liver cell nuclei was demonstrated *in vitro*. Nuclear supernatant revealed also very remarkable incorporation.

P. Szafrański und H. Wehr

Institut für Biochemie und Biophysik, Polnische Akademie der Wissenschaften und Lehrstuhl für physiologische Chemie, Medizinische Hochschule, Warschau (Polen), 16. Januar 1961.

[7] G. F. Kalf und M. V. Simpson, J. biol. Chem. *234*, 2943 (1959).

Studies on Enzymic β-Hydroxylation of Phenylethyl Amines[1]

It has previously been reported that several phenylethylamines inhibit the conversion of dopamine to norepinephrine, by dopamine-β-oxidase. In order to establish the nature of the inhibition, three of the amines, namely phenylethylamine, 3-methoxydopamine, and *dl*-*p*-hydroxy-α-methylphenyl-4-ethylamine (*p*-hydroxyamphetamine) were investigated as possible substrates of dopamine-β-oxidase. These amines were added to a mixture which contained the following components (in μ*M*): potassium phosphate buffer, pH 6.4, 100; (1-methyl-2-phenyl)-ethyl hydrazine hydrochloride, 1.3; ascorbic acid, 6; fumaric acid, 10; ATP, 12.5. To this mixture 0.2 ml of the enzyme was added[2] and the final volume was adjusted with phosphate buffer pH 6.4 to 1 ml. The reaction mixture was incubated for 20 min at 37°C using air as a gas phase. At the end of the period of the incubation, the reaction was stopped by the addition of 0.5 ml of 3% trichloroacetic acid. The precipitated proteins were removed by centrifugation and the supernatant fluid was assayed for the reaction products.

Hydroxylation of Phenylethylamine. The deproteinized incubation mixture which contained phenylethylamine as a substrate was passed through a Dowex-50 H^+ column and the absorbed amines were eluted with 3*N* NH_4OH. After evaporation in vacuum, the residue was submitted to two dimensional chromatography using butanol acetic acid and isopropyl alcohol-aqueous amonia as solvent systems. A spot having the same Rf value and yielding the same color reaction with ninhydrin as authentic phenylethanolamine was obtained (Table).

[1] This work was supported by grants from the National Institutes of Health.

[2] The enzyme was prepared by the method of E. Y. Levin et al.[3] but the purification on calcium phosphate gel was omitted.

Hydroxylation of 3-Methoxy-H³ dopamine[4]. The deproteinized incubation mixture which contained 3-methoxy-H³ dopamine as a substrate was adjusted to pH 4 and the amines present in the mixture were separated as previously described[6]. The acetylated amines were chromatographed in the Bush C solvent system and were scanned for radioactive zones. Two radioactive zones were detected. One radioactive zone had the same mobility as acetylated 3-methoxy dopamine, and the other as acetylated 3-methoxy norepinephrine. The radioactive zone with the same mobility as 3-methoxy-norepinephrine was eluted and diluted with non-radioactive acetylated 3-methoxy norepinephrine and rechromatographed in the Bush C solvent system. All the radioactivity was found to be associated with acetylated 3-methoxy norepinephrine.

Hydroxylation of Hydroxyamphetamine. The amines present in the deproteinized incubation mixture which contained hydroxyamphetamine as a substrate were acetylated and subsequently chromatographed in the Bush C solvent system. A spot having the same Rf value and yielding the same color with diazotized sulfanilic acid as authentic *p*-hydroxyphenyl propanolamine was obtained (Table).

Chromatographic separation of substrate from enzymatic formed β-hydroxylated product

Substrate	Product	Rf value		Color reaction on paper	
		Substrate	Product	Substrate	Product
Phenylethyl amine	phenyl-ethanol amine (α-phenyl-β-amino ethanol)	0.63[a]	0.55[a]	brown	blue
3-methoxy-H³ dopamine	3-methoxy-H³ norepinephrine	0.9[b]	0.42[b]	—	—
dl-p-hydroxy-α-methyl-phenylethyl-amine (*p*-hydroxy-amphetamine)	*dl-p*-hydroxy-α-methyl-phenyl-β-amino ethanol	0.75[b]	0.31[b]	red	yellow

[a] The solvent system was butanol acetic acid water.
[b] The acetylated compounds were chromatographed in the 'C' solvent system of BUSH[10].

The *in vitro* β-hydroxylation of phenylethylamine, 3-methoxy dopamine and *p*-hydroxyamphetamine may also occur *in vivo* and represent an important metabolic path for these compounds. It is possible that the pharmacological activity of phenylethylamine and *p*-hydroxyamphetamine is a result of the β-hydroxylation of these compounds to the corresponding hydroxy derivatives. In this connection it may be interesting to report that rats pretreated with ipronazid and then treated with phenylethanolamine or with phenylethylamine show severe excitation.

Although the conversion of 3-methoxy dopamine to 3-methoxy-norepinephrine occurs to a lesser degree than the conversion of dopamine to norepinephrine[7], it is possible that some of the 3-methoxy norepinephrine formed *in vivo* derives from the 3-methoxy dopamine and not as previously assumed only from norepinephrine.

Since it has been previously shown that amphetamine like *p*-hydroxyamphetamine inhibits the conversion of dopamine to norepinephrine[8] it may be assumed therefore that amphetamine is also a substrate of dopamine β-oxidase.

Finally, the present findings show that a quinoid structure is not a requirement for enzymic β-hydroxylation, and therefore, in its biogenesis norepinephrine need not pass through a quinoid intermediate as previously postulated[9].

Zusammenfassung. Phenylethylamin, 3-Methoxy-dopamin und *p*-Hydroxyamphetamin werden durch Dopamin-β-oxidase in die entsprechende β-Hydroxy-Verbindung umgewandelt.

M. GOLDSTEIN and J. F. CONTRERAS

Department of Psychiatry and Neurology, Neurochemistry Laboratory, New York University College of Medicine, New York, May 2, 1961.

[3] E. Y. LEVIN et al., J. biol. Chem. *235*, 2080 (1960).
[4] The 3-methoxy-H³ dopamine was prepared enzymatically by the method of J. AXELROD et al.[5].
[5] J. AXELROD et al., J. biol. Chem. *233*, 697 (1958).
[6] M. GOLDSTEIN et al., Proc. Soc. exp. Biol. Med. *103*, 137 (1960).
[7] M. GOLDSTEIN et al., to be published.
[8] M. GOLDSTEIN et al., Biochem. Pharmacol., in press.
[9] S. SENOH et al., J. Amer. chem. Soc. *81*, 6236 (1959).
[10] I. E. BUSH, Biochem. J. *50*, 370 (1951).

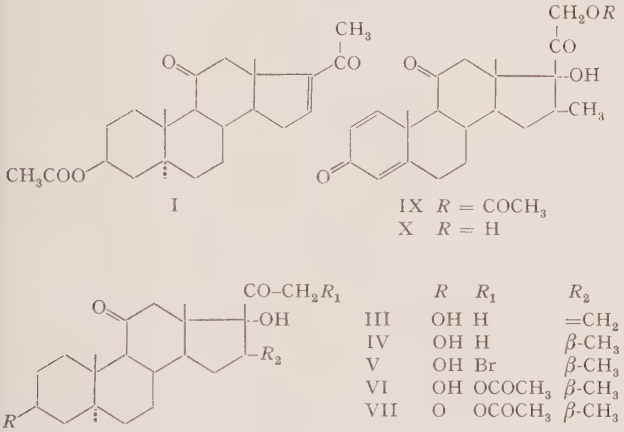
16-β-Methylprednisone from Hecogenin

On the basis of recent reports[1–3], we have studied a new synthetic way to obtain 17-hydroxy-16β-methyl-5α-pregnane derivatives in order to prepare *16β-methyl-prednisone* starting from 5α-pregn-16-en-3β-ol-11, 20-dione acetate (I), easily available from hecogenine[4–6].

Compound I was methylated at C-16 both with diazomethane (through the intermediate pyrazoline) and with a new method[7,8]. The 16-methyl-5α-pregn-16-en-3β-ol-11, 20-dione acetate treated with H_2O_2 in alkaline medium yielded the 16α, 17α-epoxy derivative (II), m.p. 178–183°, $[\alpha]_D$ + 88.5° ($CHCl_3$), + 79.5° (dioxane); *Anal.* calc. for $C_{22}H_{32}O_4$: C 73.3; H 8.95; found: C 73.51; H 8.99. When reacted upon with *p*-toluenesulfonic acid in benzene, II rearranged into 16-methylene-5α-pregnan-3β, 17α-diol-11, 20-dione (III), m.p. 273–278°, $[\alpha]_D$ – 10.2° (CH_3OH:$CHCl_3$ 1:1), *Anal.* calc. for $C_{22}H_{32}O_4$: C 73.3; H 8.95; found: C 73.30; H 8.81. Hydrogenation of III with 5% palladium on calcium carbonate in methanol gave 16β-methyl-5α-pregnan-3β, 17α-diol-11, 20-dione (IV), m.p. 260–266°, $[\alpha]_D$ + 71° (dioxane); *Anal.* calc. for $C_{22}H_{34}O_4$: C 72.89;

[1] D. TAUB, R. D. HOFFSOMMER, H. L. SLATES, C. H. KUO, and N. L. WENDLER, J. Amer. chem. Soc. *82*, 4012 (1960).
[2] G. NOMINÉ, D. BERTIN, and A. PIERDET, Tetrahedron *8*, 217 (1960).
[3] D. N. KIRK, V. PETROW, M. STANSFIELD, and D. M. WILLIAMSON, J. chem. Soc. *1960*, 2385.
[4] E. M. CHAMBERLAIN, W. V. RUYLE, A. E. ERICKSON, J. M. CHEMERDA, L. M. ALIMINOSA, R. L. ERICKSON, G. E. SITA, and M. TISHLER, J. Amer. chem. Soc. *73*, 2396 (1951).
[5] C. DJERASSI, E. BATRES, J. ROMO, and G. ROSENKRANZ, J. Amer. chem. Soc. *74*, 3634 (1952).
[6] A. F. B. CAMERON, R. M. EVANS, J. C. HAMLETT, J. S. HUNT, P. G. JONES, and A. G. LONG, J. chem. Soc. *1955*, 2807.
[7] P. DE RUGGIERI, Farmaco, Ed. sci. *16*, 58 (1961).
[8] K. HEUSLER, J. KEBRLE, C. MEYSTRE, H. UEBERWASSER, P. WIELAND, G. ANNER, and A. WETTSTEIN, Helv. chim. Acta *42*, *42*, 2043 (1959).

H 9.45; found: C 73.15; H 9.40. Under suitable experimental conditions (neutral pH, slow hydrogenation rate) the formation of the 16α-methyl-isomer may be completely avoided. A chloroform suspension of IV, in the presence of a small amount of methanol, was treated with bromine and hydrobromic acid to give 21-bromo-16β-methyl-5α-pregnan-3β,17α-diol-11,20-dione (V), m.p. 220 to 223°, $[\alpha]_D$ + 90.1° (dioxane); *Anal.* calc. for $C_{22}H_{33}BrO_4$: C 59.86; H 7.54; Br 18.1; found: C 59.70; H 7.43; Br 18.38. Potassium acetate in refluxing acetone converted V to 16β-methyl-5α-pregnan-3β,17α,21-triol-11,20-dione 21-acetate (VI), m.p. 223–227°, $[\alpha]_D$ + 95.8° (dioxane); *Anal.* calc. for $C_{24}H_{36}O_6$: C 68.58; H 8.63; found: C 68.06; H 8.54. Chromic acid in acetone[9] or chromic anhydride in acetic acid or N-bromoacetamide oxidized VI to 16β-methyl-5α-pregnan-17α,21-diol-3,11,20-trione-21-acetate (VII), m.p. 210–213°, $[\alpha]_D$ + 120° (dioxane); *Anal.* calc. for $C_{24}H_{34}O_6$: C 68.9; H 8.19; found: C 68.3; H 7.82. Compound VII, when treated with bromine in dioxane, yielded the 2,4-dibromo-derivative (VIII), which, as crude product, was dehydrobrominated in dimethylformamide solution[10] to give *16β-methylprednisone-21-acetate* (*IX*), m.p. 224–229°, $[\alpha]_D$ + 210° (dioxane); λ_{max} 238 mμ, $E^{1\%}_{1\,cm}$ 358 (methanol). IX was de-acetylated by conventional methods to *16β-methylprednisone* (*X*), m.p. 200–205°. $[\alpha]_D$ + 200° (dioxane), $E^{1\%}_{1\,cm}$ 416 at 239 mμ in methanol. IX and X are identical with authentic specimens.



I

IX $R = COCH_3$
X $R = H$

	R	R_1	R_2
III	OH	H	$=CH_2$
IV	OH	H	β-CH_3
V	OH	Br	β-CH_3
VI	OH	$OCOCH_3$	β-CH_3
VII	O	$OCOCH_3$	β-CH_3

Zusammenfassung. Es wird über die Herstellung des 16-Methylprednisons berichtet, welche vom Hecogenin ausgehend über ca. 15 Stufen durchgeführt wird. Als wichtige Zwischenstufe treten 5α-Pregn-16-en-3β-ol-11,20-dion-Acetat und 16-Methylen-5α-pregnan-3β,17α-diol-11,20-dion auf: letzteres wird durch eine stereospezifische katalytische Reduktion in das entsprechende 16β-Methylderivat umgewandelt.

G. G. Nathansohn, G. Winters, and E. Testa

Research Laboratories of Lepetit S.p.A., Milano (Italy), June 26, 1961.

[9] K. Bowden, I. M. Heilbron, E. R. H. Jones, and B. C. L. Weedon, J. chem. Soc. *1946*, 39.

[10] R. Joly, J. Warnant, G. Nominè, and D. Bertin, Bull. Soc. chim. Fr. [5] *15*, 366 (1958).

Conversion of 17α-Hydroxypregnenolone to Cortisol

In the commonly accepted scheme of adrenal corticoid biosynthesis, cortisol is considered to arise from the conversion of pregnenolone (3β-hydroxy-pregn-5-en-20-one) to progesterone, which is then successively hydroxylated to cortisol. It has been demonstrated[1], however, that pregnenolone can undergo initial 17α-hydroxylation, resulting in the formation of 17α-hydroxypregnenolone, and this product has been isolated from dog adrenal vein blood[2]. It has been proposed[3] that 17α-hydroxypregnenolone is the precursor of dehydroepiandrosterone (DHA), either in the adrenal or elsewhere, and this conversion has been shown to occur in a patient with adrenal cancer[4] and in particulate fractions of beef adrenal and testis[1]. We have examined the metabolism of 17α-hydroxypregnenolone and have found that it is converted to 17α-hydroxyprogesterone, 11-deoxycortisol and cortisol by adrenal slices from the human, guinea pig and rat.

Experimental. 17α-hydroxypregnenolone-7-H^3 (New England Nuclear Corp.) was diluted with stable 17α-hydroxypregnenolone and chromatographed in the system toluene/propylene glycol. Material from the major peak contained 93% of the radioactivity and had a specific activity of 2.9×10^8 cpm/mg. Pregnenolone-7-H^3 (New England Nuclear Corp.) was diluted with stable pregnenolone and chromatographed in the system Bush B_3. The major peak contained 89% of the radioactivity and had a specific activity of 1.8×10^8 cpm/mg. Tritium and C^{14} counting were performed in the Packard Tri-Carb Scintillation spectrometer at an approximate efficiency of 15% for tritium and 80% for carbon^{14}.

Incubations were performed in pH 7.4 saline-phosphate buffer[5] for 3 h under air at 37°C. The human adrenals were obtained from two women undergoing adrenalectomy for breast cancer. The rats and guinea pigs were killed by decapitation.

Human adrenal slices with total weights of 3.1 g and 5.5 g were incubated with 5.2×10^6 cpm and 1.3×10^7 cpm respectively of 17α-hydroxypregnenolone. Similarly 3.1 g of slices were incubated with 2.8×10^6 cpm of pregnenolone. A total of 504 mg of guinea pig adrenal slices and 374 mg of rat adrenal slices were each incubated with 5.2×10^6 cpm of 17α-hydroxypregnenolone. After incubation, 200 γ of the following steroids were added: cortisol, 11-deoxycortisol, 17α-hydroxyprogesterone, progesterone, corticosterone and DHA. The contents of the flask were extracted with 80% acetone, defatted in cold 70% methanol, and partitioned between hexane and 70% methanol. The 3β-hydroxysteroids were separated with digitonin. The non-digitonin-precipitable steroids were initially chromatographed in chloroform/formamide. Position of the compounds was determined by UV absorption and the Zimmerman reaction, and radioactivity by scanning on a Baird-Atomic strip scanner. Evidence

[1] F. W. Kahnt, R. Neher, K. Schmid, and A. Wettstein, Exper. *17*, 1 (1961).

[2] H. Carstensen, G. W. Oertel, and K. Eik-Nes, J. biol. Chem. *234*, 2570 (1959).

[3] S. Lieberman and S. Teich, J. clin. Endocrin. *13*, 1140 (1953).

[4] S. Solomon, A. C. Carter, and S. Lieberman, J. biol. Chem. *235*, 351 (1960).

[5] J. R. Robinson, Biochem. J. *45*, 68 (1949).

for the conversion of the labelled 17α-hydroxypregnenolone to other steroids was obtained as follows:

Cortisol was eluted and chromatographed in system Bush C. An aliquot was acetylated with acetic anhydride in pyridine and chromatographed in Bush B_3 and cyclohexane:dioxane/methanol:water (4:4/2:1)[6]. An aliquot of the cortisol from Bush C was oxidized with sodium bismuthate and chromatographed in Bush B_1. After elution, it was oxidized with chromic acid for 10 min and rechromatographed in system Bush B_1, in which the Rf was equal to that of androst-4-en-3,11,17-trione. The radioactive peak migrated with the carrier steroid throughout. In one study with the human adrenal slice, the cortisol was acetylated with C^{14}-acetic anhydride and the ratio of H^3 to C^{14} determined after chromatography in Bush B_3, cyclohexane:dioxane/methanol:water, and after elution with 2% acetone in chloroform from a silica gel column. The specific activities of the eluted cortisol acetate were 93, 90, and 88 in the two paper systems and from the peak tubes of the column respectively.

17α-hydroxyprogesterone was chromatographed in ligroin/propylene glycol and Bush B_3. It could not be acetylated with acetic anhydride in pyridine. Acetylation in about 60% yield was accomplished by adding *p*-toluenesulfonic acid to the acetylation reagents. The resulting compound was chromatographed in Bush A where it migrated at the same rate as 17α-acetoxyprogesterone. The radioactive peak coincided with the carrier steroid throughout.

11-deoxycortisol was chromatographed in Bush B_3, an aliquot acetylated and rechromatographed in Bush A and the dioxane system. The acetylated product was reduced with sodium borohydride, oxidized with sodium bismuthate and chromatographed in Bush A. An aliquot of the material from Bush B_3 was oxidized with bismuthate. These two bismuthate oxidation products had an Rf in Bush A identical to androstenedione. The radioactive peak migrated with the carrier compound in all systems.

Dehydroepiandrosterone was successively chromatographed in ligroin/propylene glycol and Bush A. After acetylation, the product was chromatographed in heptane/phenyl Cellosolve. The mobilities of the radioactive peak and the carrier compound coincided. In the human and guinea pig adrenal slices, the DHA contained less than 5% of the combined radioactivity of the three 17α-hydroxysteroids discussed above. Tritium-labelled DHA could not be identified in the rat adrenal slice incubation.

Corticosterone and *progesterone* were not tritium-labelled after incubation with 17α-hydroxypregnenolone.

The human adrenal slices converted 9% of the labelled 17α-hydroxypregnenolone to cortisol and 6% of the pregnenolone to cortisol. Thus 17α-hydroxypregnenolone was at least as good a precursor of cortisol as was pregnenolone. In several separate but not paired incubations with guinea pig adrenal slices, pregnenolone and 17α-hydroxypregnenolone were equally active as cortisol precursors.

Discussion. The existence of a biosynthetic pathway to 17α-hydroxyprogesterone via 17α-hydroxypregnenolone has been tacitly assumed[1], but evidence has not been presented to support this. It is clear from the present study that 17α-hydroxypregnenolone is a good substrate for the adrenal 3β-ol dehydrogenase system and that in the adrenal slice this constitutes a major metabolic transformation of the compound. The preliminary comparison of the relative activities of pregnenolone and 17α-hydroxypregnenolone suggests that 17α-hydroxylation of pregnenolone may be as rapid as the conversion of pregnenolone to progesterone. These results do not support the view that 17α-hydroxypregnenolone is the important precursor of DHA *within the adrenal gland*, since the conversion of 17α-hydroxypregnenolone to DHA was relatively small. This, of course, does not exclude the conversion of 17α-hydroxypregnenolone to DHA by desmolases outside the adrenal gland as has been suggested earlier[3]. Indeed, the finding that 17α-hydroxypregnenolone was a precursor of urinary pregnanetriol in two elderly adrenalectomized women[7] suggests that an extra-adrenal 3β-ol dehydrogenase system may be present.

It is of interest that 17α-hydroxypregnenolone was a suitable substrate for the 3β-ol-dehydrogenase system of the rat adrenal. Thus, when a 17α-hydroxylated substrate was present, the rat adrenal was able to synthesize cortisol[8].

Zusammenfassung. Nebennierenschnitte von Ratten, Meerschweinchen und Menschen synthetisierten 17α-Hydroxyprogesteron, 11-Deoxycortisol und Cortisol aus 17α-Hydroxypregnenolon. Diese Verbindung, als Ausgangsprodukt für die Cortisolsynthese, ist ebenso wirksam wie pregnenolon. Die Umwandlung von 17α-Hydroxypregnenolon in Dehydroepiandrosteron verläuft weniger vollkommen als zu 17α-Hydroxycorticoiden.

M. B. LIPSETT[9] and B. HÖKFELT

Department of Endocrinology, Karolinska Hospital, Stockholm (Sweden), June 6, 1961.

[6] B. KLIMAN and R. E. PETERSON, J. biol. Chem. *235*, 1639 (1960).
[7] K. FOTHERBY and D. N. LOVE, J. Endocrin. *21*, 129 (1960).
[8] *Acknowledgement:* We wish to thank Dr. R. NEHER, Basle, for his helpful comments.
[9] Present address: National Cancer Institute Bethesda (Md.).

Identification du glucosiduronate de 5β-pregnane 3α,21-diol 20-one (THDOC) après administration de cortexone

Nous avons administré à un homme normal 50 mg de cortexone par voie orale en 3 prises et les urines de 24 h ont été recueillies. Les stéroïdes libres et conjugués sont extraits à pH 7 par le mélange éther/éthanol 3/1 v/v[1]. Les corticostéroïdes libres sont extraits par le dichlorométhane et les corticostéroïdes conjugués sont fractionnés sur alumine en ester-sulfates et glucosiduronates[2].

La fraction glucosiduronate a été chromatographiée sur celite purifié en utilisant les solvants: toluène-acétate de buthyle-butanol (40:50:10) comme phase mobile et le mélange acide acétique-eau-méthanol (5:45:50)[3] comme phase stationnaire. Les glucosiduronates sont détectés par la réaction de Tollens, rassemblés et chromatograhpiés sur papier dans ce même système. Les taches de glucosiduronates ont été révélées par le réactif acide acétique-sulfurique 9/1 (v + v)[4].

[1] R. W. H. EDWARDS, A. E. KELLIE et A. P. WADE, Mem. Endocrin. London *2*, 53 (1953).
[2] O. CREPY, M. F. JAYLE et F. MESLIN, Acta endocrinol. *24*, 233 (1957).
[3] J. R. PASQUALINI, R. ZELNIK et M. F. JAYLE, Exper. *16*, 317 (1960).
[4] G. CAVINA, Rend. Inst. sup. Sanita (Roma) *20*, 923 (1957).

Tab. I. Rf du stéroïde obtenu a partir de l'extrait urinaire

Stéroïdes	Toluène/propanediol R_{THDOC}	Isooctane/méthanol-eau (5/3–2) R_{THDOC}
Stéroïde (extrait urinaire)	1	1
5α-pregnane 3β,21-diol 20-one	0,85	0,88
5β-pregnane 3α,21-diol 20-one (THDOC)	1	1
5β-pregnane 3β,21-diol 20-one	1,25	1,66

Tab. II. Rf de l'acétate du corticostéroïde étudie par chromatographie sur papier non impregné de phase stationnaire

Acétate de stéroïde	Solvants	
	Ligroïne $R_{diac.THDOC}$	Isooctane $R_{diac.t(THDOC)}$
Acétate de stéroïde (extrait urinaire)	1	1
3,21-diacétate de 5α-pregnane 3β,21-diol 20-one	0,60	0,52
3,21-diacétate de 5β-pregnane 3α,21-diol 20-one	1	1

Le chromatogramme est fractionné en 5 parties et la fraction de glucosiduronate contenant les corticostéroïdes peu polaires est éluée par l'éthanol à 50%. La migration du glucosiduronate étudié est par rapport à celle du glucosiduronate de tétrahydrocortisone[5] (G · THE) de: $R_{G.THE} = 2{,}70$.

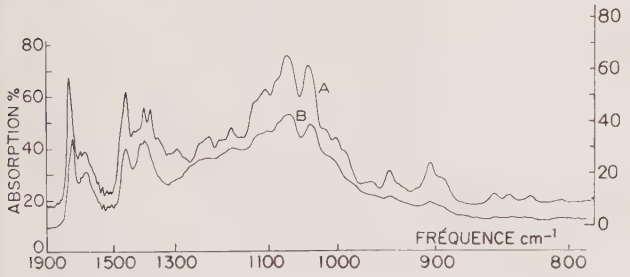
La migration électrophorétique dans une solution carbonate d'ammonium à pH 8,7 du glucosiduronate de l'extrait urinaire s'est avérée identique à la migration du glucosiduronate de THE et égale à 0,8 cm/h.

Identification du corticostéroïde. Le glucosiduronate étudié a été hydrolysé par la β-glucuronidase et chromatographié sur papier ainsi que 3 isomères de la tétrahydrocortexone (THDOC). Les résultats sont indiqués sur Tableau I.

Après acétylation, les acétates de corticostéroïdes sont chromatographiés sur papier sans phase stationnaire selon une méthode que nous avons mise au point[6] Tableau II.

Le corticostéroïde étudié réduit le bleu de tétrazolium, il ne donne ni les réactions de Porter et Silber, ni les réactions du groupement Δ_4 3 C=O. En solution sulfurique, il a un maximum d'absorption à 320 mμ.

Le spectre infrarouge du corticostéroïde étudié (B) présente les mêmes bandes d'absorption que le 5β-pregnane 3α,21-diol 20-one de synthèse (A) comme il est indiqué dans la Figure.



Spectre infrarouge du 5β-pregnane 3α,21-diol 20-one (THDOC) de synthèse (courbe A) et celui du corticosteroide étudié (courbe B).

La quantité de tétrahydrocortexone évaluée dans cette fraction est de 2100 μg/24 h.

Dans la fraction ester-sulfate, nous n'avons détecté ni cortexone, ni aucun de ses métabolites hydrogénés.

Le seul métabolite que nous avons identifié dans la fraction libre est le 5β-pregnane 3α,21-diol 20-one, il a été évalué en 300 μg/24 h.

Discussion. Richardson et al.[7] avaient trouvé après administration de 200 mg de cortexone, 1500 μg de l'hormone non transformée dans les urines de 24 h ainsi que 2700 μg de THDOC. Dans notre expérience, nous n'avons pas détecté de cortexone, peut-être faut-il en rendre responsable l'administration d'une dose plus faible de cortexone. Nous n'avons pas trouvé de dihydrocortexone qui avait été identifiée par Gandy et al. [8] dans un cas d'hyperplasie congénitale de la corticosurrénale.

Summary. After administration of cortexone to a normal man, we isolated the 5β-pregnana 3α,21-diol 20-one glucuronide in human urine. We found 90% of this corticosteroid in the glucuronide fraction; the remaining 10% was in the free fraction.

We found neither the cortexone nor its metabolites di- or tetrahydrogenated in the ester-sulphate fraction.

The tetrahydrocortexone-glucuronide was identified by paper chromatography and by electrophoresis.

J. R. Pasqualini et M. F. Jayle

Laboratoire de Chimie Biologique, Faculté de Médecine, Paris (France), le 5 mai 1961.

[5] Nous remercions vivement le Dr. J. J. Schneider d'avoir eu l'amabilité de nous procurer le glucosiduronate de tétrahydrocortisone de synthèse.

[6] J. R. Pasqualini et M. F. Jayle, J. Chromat. *5*, 336 (1961).

[7] E. M. Richardson, J. C. Touchstone, F. C. Dohan, H. Bulaschenko, I. Landolt et W. Applin, J. clin. Invest. *34*, 285 (1955).

[8] H. M. Gandy, E. H. Keutmann et A. J. Izzo, J. clin. Invest. *39*, 364 (1960).

Loss of Tryptophan Pyrrolase Cofactor from Liver Cytoplasmic Structures of 3'-Methyl-4-dimethylaminoazobenzene Fed Rats

The induced formation of Tryptophan pyrrolase[1] is by far the best studied model of enzyme induction in animals[2]. It was reported recently that *L*-tryptophan administration does not increase the tryptophan pyrrolase activity in Novikoff hepatoma[3] or in Dunning LC 18/81 A hepatoma[4]. According to FIALA and FIALA[5,6], azo-cancerogen feeding of rats strongly inhibits the *L*-tryptophan induction of tryptophan pyrrolase. In the present investigations, the induced formation of tryptophan pyrrolase in the early stages of 3-Me-4-DAB cancerogenesis was studied further.

Experiments were carried out with albino rats (100 to 200 g of body weight) fed a semi-synthetic diet containing 0.06% 3-Me-4-DAB[7,8]. According to previous studies, this diet enhances tumour formation after a period of about 6 months[7]. Tryptophan pyrrolase was induced by *L*-tryptophan (Hoffmann-La Roche), 50–100 mg/100 g body weight, or Hydrocortisone (Schering), 2 mg/100 g body weight, given intraperitoneally. Tryptophan pyrrolase activity was determined by the method of KNOX[9]; protein-according to LOWRY et al.[10].

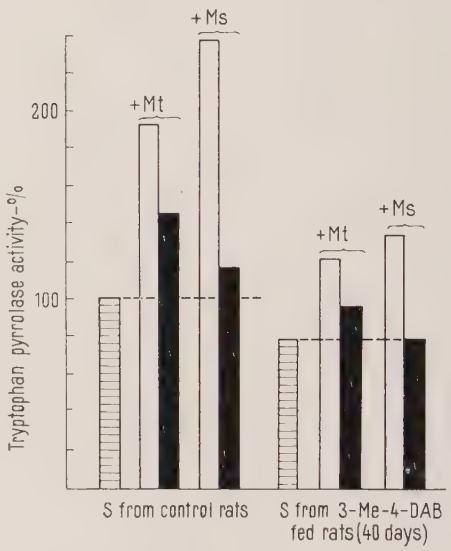
In a first series of experiments, *L*-tryptophan and Hydrocortisone inductions of tryptophan pyrrolase activity in control and cancerogen fed animals were studied, taking into consideration the independance of these two ways of tryptophan pyrrolase induction[11]. The results are represented in the Table. As may be seen, 3-Me-4-DAB feeding for 40 days decreases the basal level of tryptophan pyrrolase activity with 55% in comparison with controls. The induced increase of tryptophan pyrrolase is strongly reduced in the 3-Me-4-DAB group with both *L*-tryptophan[5,6] and hydrocortisone as inductors.

In order to localize better the early injury of liver cell structures by the cancerogen, intracellular distribution of tryptophan pyrrolase was studied. These studies were stimulated by the recent finding of GREENGARD and FEIGELSON[12] that a tryptophan pyrrolase cofactor, localized in mitochondria and microsomes, is released from these structures after induction and is responsible, at least in part, for the induced increase of tryptophan pyrrolase activity. The liver homogenate[9] was fractionated in a MSE 'Superspeed 25' refrigerated centrifuge: nuclei (N) 10 min at 600 *g*; mitochondria (Mt) 20 min at 12000 *g*, and microsomes (Ms) 90 min at 75000 *g*. It was found that nuclei, mitochondria, and microsomes were devoid of tryptophan pyrrolase activity, while the 75000 *g* supernatant (S) has only 30–40% of the activity of the original homogenate. Addition of Mt or Ms fractions to the supernatant greatly increases its tryptophan pyrrolase activity, the level of the total homogenate being reached. A potassium chloride media was found essential for the release of tryptophan pyrrolase cofactor from cytoplasmic structures, no activation being observed with 0.25 *M* sucrose media.

The basal tryptophan pyrrolase level in the supernatant of 3-Me-4-DAB fed rats is 21% lower when compared with that of control animals. The activation of the supernatant (S) from control rats by suspensions of Mt and Ms isolated from control and 3-Me-4-DAB fed rats is represented in the Figure. The Ms and Mt concentration is the same as in the original homogenate. As may be seen, microsomes and mitochondria isolated from cancerogen fed animals are unable to increase the tryptophan pyrrolase activity of the supernatant, thus contrasting with the cytoplasmic structures from normal animals. Experiments with the supernatant fraction from 3-Me-4-DAB fed animals (Figure) give the same results—no activation with microsomes and mitochondria from cancerogen fed rats and marked activation with Ms and Mt isolated from controls.

Rat liver tryptophan pyrrolase activity of normal and 3-Me-4-DAB fed rats

	Control animals		40 days 3-Me-4-DAB fed animals	
	Number	μM kinurenin/h/g liver	Number	μM kinurenin/h/g liver
(1) Basal level	11	8.02	5	3.65
(2) 5 h after 50 mg/100 g *L*-tryptophan	6	35.3	3	13.91
(3) 5 h after 2 mg/100 g Hydrocortisone	6	53.1	5	14.0



Effect of liver mitochondria and microsomes from normal and 3-Me-4-DAB fed rats on tryptophan pyrrolase activity of the 75000 *g* supernatant. ☰ Basal level of the 75000 *g* supernatant (S) from rat liver homogenates. The activity of the S from normal rats taken as 100. □ Addition of suspensions of mitochondria (Mt) or microsomes (Ms) isolated from normal rat liver. ■ Addition of Mt and Ms isolated from 40 days 3-Me-4-DAB fed rats. For further details see text.

[1] T. TANAKA and W. E. KNOX, J. biol. Chem. *234*, 1162 (1959).
[2] W. E. KNOX, V. H. AUERBACH, and E. C. C. LIN, Physiol. Rev. *36*, 164 (1956).
[3] S.-K. CHAN and D. E. KIZER, Proc. Amer. Ass. Cancer Res. *3*, 11 (1959).
[4] H. G. PITOT, C. H. FOHN, W. H. CLARK, and E. FARBER, Proc. Amer. Ass. Cancer Res. *3*, 52 (1959).
[5] S. FIALA and A. E. FIALA, Nature *183*, 1532 (1959).
[6] S. FIALA and A. E. FIALA, Brit. J. Cancer *13*, 236 (1959).
[7] A. A. HADJIOLOV, Bull. Inst. Morphol. Acad. Sci. Bulgarie *2*, 423 (1957).
[8] A. A. HADJIOLOV, Z. Krebsforschg. *62*, 361 (1958).
[9] W. E. KNOX, in *Methods in Enzymology*, S. P. COLOWICK and N. O. KAPLAN, Eds., 1955, vol. 2, p. 242.
[10] O. H. LOWRY, N. J. ROSENBROUGH, A. L. FARR, and R. J. RANDALL, J. biol. Chem. *193*, 265 (1951).
[11] M. CIVEN and W. E. KNOX, J. biol. Chem. *234*, 1787 (1959).
[12] O. GREENGARD and P. FEIGELSON, Biochim. biophys. Acta *39*, 191 (1960).

The latter results show that the apoenzyme of tryptophan pyrrolase, localized in the supernatant, is not appreciably damaged in the early stages of 3-Me-4-DAB cancerogenesis. It must be noted that in all cases Mt isolated from cancerogen fed rats show some activating effect, while Ms are completely ineffective. This would suggest a more severe damage of microsomes than of mitochondria.

Similar experiments on supernatant activation were performed with prealably *L*-tryptophan induced tryptophan pyrrolase. Cell fractionation and tryptophan pyrrolase activity determinations were made 5 h after inductors application. The results of these experiments show that addition of Ms and Mt from normal rats increases the tryptophan pyrrolase activity of the S fraction isolated from either control or 3-Me-4-DAB fed rats. On the other hand, Mt and more markedly Ms, isolated from cancerogen fed animals, are almost completely devoid of such activity.

The results reported in this work show that in the early stages of rat liver cancerogenesis induced by 3-Me-4-DAB, liver cell microsomes and mitochondria are damaged in such a way that they lose their tryptophan pyrrolase cofactor. It is possible that lipoprotein membranes of ergastoplasm (microsomes) and mitochondria are the first cellular structures damaged by the cancerogen. This damage determines subsequent changes in the permeability of cytoplasmic structures as revealed by changes in swelling[13,14] and loss of cofactors[15]. Our results are consistent with the representation that structural damage to ergastoplasm and mitochondria is the cause of the metabolic changes in cancerogenesis.

Résumé. L'ingestion du cancérogène 3-méthyl-4-diméthylaminoazobenzène pendant 40 jours inhibe fortement l'induction de la tryptophane pyrrolase du foie des rats causée par le *L*-tryptophane ou bien l'hydrocortisone. Les auteurs montrent que cet effet est dû à la perte du cofacteur de la tryptophane pyrrolase des mitochondries et des microsomes des animaux soumis au régime alimentaire cancérogène.

A. A. Hadjiolov and M. D. Dabeva

Department of Biochemistry, Higher Medical Institute, Sofia (Bulgaria), March 27, 1961.

[13] J. C. Arcos and M. Arcos, Biochim. biophys. Acta *28*, 9 (1958).
[14] J. C. Arcos, G. W. Griffith, and R. W. Cunningham, J. biophys. biochem. Cytol. *7*, 49 (1960).
[15] S. Weinhouse, Adv. Cancer Res. *3*, 269 (1955).

Das Coenzym A in leukämischem Blut

Im Blut von leukämischen Individuen, vor allem in solchen mit myeloischer Leukämie, wurde eine Erhöhung der Sulfonamid- und Paraminobenzoesäure-acetylierenden Wirkung festgestellt, die sowohl *in vitro*[1] als auch *in vivo*[2] nachweisbar war. Es schien interessant, den Gehalt von Coenzym A im Blut von leukämischen und normalen Personen zu bestimmen, um festzustellen, ob man bei den ersteren eine der acetylierenden Wirkung entsprechende Erhöhung erhielt. Eine vorläufige Mitteilung über dieses Problem wurde von uns schon veröffentlicht[3]. Weitere Untersuchungen wurden zur Bestätigung, ob die Zunahme des Coenzym-A-Gehaltes vorwiegend im Plasma oder in den Blutkörperchen und in einer besonderen Gruppe derselben stattfindet, unternommen.

Die Bestimmung von Coenzym A wurde mikrobiologisch mit *Lactobacillus arabinosus* 17-5 nach Abspaltung des gebundenen Pantethins durch alkalische Phosphatase[3,4] durchgeführt. Wir untersuchten 8 Patienten mit chronischer myeloischer Leukämie, 4 mit chronischer lymphatischer Leukämie und 2 mit subakuter Retotheliose. Zum Vergleich wurde das Blut von 11 gesunden Individuen untersucht.

Die Ergebnisse der Coenzym A-Bestimmungen (Mittelwerte der verschiedenen Gruppen) sind in Tabelle I zusammengestellt. Das Vorhandensein eines höheren Coenzym A-Gehaltes im Blut von leukämischen Personen, im Vergleich zu demjenigen von Normalen und Kranken mit anderen Leukämieformen ist deutlich. Ein Vergleich des Coenzym A-Gehaltes im Vollblut, Plasma und Blutzellenanteil (durch Zentrifugieren erhalten) zeigte, dass die grösste Menge des Coenzyms A in den Blutkörperchen enthalten ist (Tabelle II). Der Anteil von Coenzym A im Plasma, sei es bei normalen oder bei leukämischen Subjekten, erwies sich als niedriger als derjenige im Vollblut, gelegentlich mag das Plasma mit Thrombozyten verunreinigt gewesen sein.

Die Trennung der Leucozyten, durchsetzt mit einer gewissen Anzahl von Thrombozyten, mittels Differenzialzentrifugation erlaubte festzustellen, dass der grösste Anteil von Coenzym A in diesen Elementen und nicht in den roten Blutkörperchen enthalten ist. Zusatz einer aus dem Vollblut abzentrifugierten gleichen Anzahl von Leucozyten zum Plasma führte zu Coenzym A-Werten in derselben Höhe wie beim Gesamtblut und eine weitere Zugabe von Leucozyten zu einer proportionalen Erhöhung des Coenzym A-Gehaltes. Es war nicht möglich, eine Korrelation zwischen der Anzahl der Leucozyten oder besonderer Formen derselben und der Höhe des Coenzym A-Gehaltes des Blutes nachzuweisen.

Tab. I. Mittel aus den Mittelwerten der einzelnen Fälle

	Fälle	Anzahl der Bestimmungen	γCoA/ml	t-Test (I→) p
I Normale	11	11	$1{,}52 \pm 0{,}38$	
II Leukämien	14	22	$5{,}29 \pm 0{,}63$	$< 0{,}001$
IIa Myelämien	8	14	$6{,}89 \pm 0{,}55$	$< 0{,}001$
IIb andere Leukämien	6	8	$3{,}15 \pm 0{,}55$	$< 0{,}05$

Tab. II. Coenzym A-Gehalt in γ/ml

	Gesamtblut	Plasma
Leukämien	7,80	3,40
Normalblut	2,48	1,35

[1] G. Salvi, U. Ambanelli, G. Rosati und R. Starcich, Haematologica (Pavia) *43*, 1051 (1958).
[2] U. Ambanelli, G. Salvi und R. Starcich, Sangre *2*, 213 (1957).
[3] U. Ambanelli, F. Bonati und G. Salvi, Boll. Soc. ital. Biol. sper. *35*, 2100 (1959).
[4] Wir danken Raetia Zuern für die Durchführung der mikrobiologischen Bestimmungen.

Hingegen besteht eine Korrelation zwischen der acetylierenden Wirkung[5] und dem im Blut enthaltenen Coenzym A. Aus einer Gruppe von 28 Untersuchungen erhält man einen Korrelationskoeffizienten von $r = +0{,}6244$ ($P \sim 0{,}001$). Diese Untersuchungen lassen uns zum Schluss kommen, dass das im Blut vorhandene Coenzym A zum grössten Teil in den Leucozyten und vielleicht auch in den Thrombozyten enthalten ist; hingegen ist der Gehalt im Plasma und in den Erythrozyten niedrig.

Diese Befunde stehen vielleicht in Beziehung zu kürzlich veröffentlichten Untersuchungen, wonach die Synthese der Lipoide – ein Vorgang, in welchem das Coenzym A eine erste Rolle spielt – im zirkulierenden Blut vorwiegend in den Leucozyten und in geringerem Grade in den Thrombozyten stattfindet, während sie in den reifen Erythrozyten und im Plasma fast ganz fehlt[6,7].

Riassunto. Il Coenzima A nel sangue di soggetti leucemici, in particolare con leucemia mieloide, appare nettamente aumentato in confronto al sangue normale.

Il Coenzima A è contenuto in prevalenza nei leucociti e probabilmente anche nelle piastrine, mentre è scarso nel plasma e nei globuli rossi.

U. Ambanelli, F. Bonati und G. Salvi

Istituto di Clinica Medica della Università di Parma und Laboratori Ricerche della Bracco Ind. Chimica, Milano (Italien), 18. Mai 1961.

[5] µg von acetyliertem PABA während 24 h in 1 ml Blut bei 37°.
[6] P. Marks, A. Gellhorn und C. Kidson, J. biol. Chem. *235*, 2579 (1960).
[7] E. Rowe, A. Allison und J. Lovelock, Biochim. biophys. Acta *41*, 310 (1960).

C16-Methyl Derivatives of Progesterone and 17α-Acetoxyprogesterone: Preparation and Biological Activities

In view of the recent publication[1] describing the preparation of certain C16-methyl steroids, we wish to report here the progestational activities associated with several derivatives of 16α-methylprogesterone prepared in these Laboratories.

In Table I are given the comparative biological activities of 16α-methylprogesterone[2] (I) and its 2α-methyl (II)-, 6α-methyl (III)[3]- and 6α-fluoro (IV)-derivatives. Also included are the physical properties of the newly prepared compounds II and IV. 2α,16α-Dimethylprogesterone (II) was obtained by alkylation[4] of the C2-glyoxylic ester of 16α-methyl-progesterone (I). 6α-Fluoro-16α-methylprogesterone was prepared by employing either the epoxide-hydrofluoric acid[5] or the N-bromoacetamide-hydrofluoric acid[6] techniques for the introduction of the C6-fluorine atom, each utilizing 16α-methylpregnenolone[2] as starting material.

Summarized in Table II are the biological activities and physical properties of the 16α-methyl derivatives of 17α-hydroxyprogesterone. 16α-Methyl-17α-hydroxyprogester-

[1] E. Batres, T. Cardenas, J. A. Edwards, G. Monroy, O. Mancera, C. Djerassi, and H. J. Ringold, J. org. Chem. *26*, 871 (1961).
[2] R. E. Marker and H. M. Crooks Jr., J. Amer. chem. Soc. *64*, 1280 (1942).
[3] S. Bernstein, E. W. Cantrall, and J. P. Dusza, J. org. Chem. *26*, 269 (1961).
[4] J. A. Hogg, F. H. Lincoln, R. W. Jackson, and W. J. Schneider, J. Amer. chem. Soc. *77*, 6401 (1955).
[5] J. A. Hogg, G. B. Spero, J. L. Thompson, B. J. Magerlein, W. P. Schneider, D. H. Peterson, O. K. Sebek, H. C. Murray, J. C. Babcock, R. L. Pederson, and J. A. Campbell, Chem. and Ind. *1958*, 1002.
[6] A. Bowers, J. Amer. chem. Soc. *81*, 4107 (1959).

Tab. I. Subcutaneous progestational activity – Clauberg assay[a]

Compound	M.P. °C	$[\alpha]_D$ ($CHCl_3$)	λ_{max}^{MeOH} mµ (ε)	Approx. activity (Progesterone = 1)
16α-Methylprogesterone (I)	135–138.5	+ 160°	240 (16900)	1
2α,16α-Dimethylprogesterone (II)[b]	151–152	+ 169°	240 (14800)	inactive[c]
6α,16α-Dimethylprogesterone (III)	113–116.5	+ 145°	242 (16100)	1
6α-Fluoro-16α-methylprogesterone (IV)	144–146	+ 18°	236 (14900)	1

[a] Assays were performed by the Endocrine Laboratories, Madison (Wisconsin, U.S.A.) and the MacPhail modification of the Clauberg assay was used. [b] All new compounds recorded therein have been satisfactorily characterized by elemental analysis. [c] i.e. at a 1 mg total dose level.

Tab. II. Oral progestational activity – Clauberg assay[a]

Compound	M.P. °C	$[\alpha]_D$ ($CHCl_3$)	λ_{max}^{MeOH} mµ (ε)	Approx. activity (17α-Acetoxyprogesterone = 1)
16α-Methyl-17α-hydroxyprogesterone (V)[b]	180–183.5	+ 86°	242 (17200)	inactive[c]
16α-Methyl-17α-acetoxyprogesterone (VI)	233–236	+ 80°	242 (15200)	1
16α-Methyl-6-dehydro-17α-acetoxy-progesterone (VII)	212–214	+ 15°	283 (26100)	15
16α-Methyl-1-dehydro-17α-acetoxy-progesterone (VIII)	227–228	+ 30°	244 (15000)	8
16α-Methyl-1,6-bisdehydro-17α-acetoxy-progesterone (IX)	213–214	– 18°	221 (13900) 257 (12100) 299 (14000)	66

[a] See Table I, footnote [a]. [b] See Table I, footnote [b]. [c] i.e. at a 1 mg total dose level.

one[7] (V) was prepared from 16α-methyl Reichstein's Substance S[8,9] by reduction[10] of the 21-tosylate of the latter. Compound V was also prepared in a seven-stage synthesis from 16α-methylpregnenolone acetate[2] *via* the intermediate 5α,6α-epoxy-17α-hydroxy-16α-methylpregnanolone benzoate [m.p. 228–230°, $[\alpha]_D = -49°$ ($CHCl_3$)]. Acetylation of the 17α-hydroxyl group provided the 17α-acetate (VI). Bromination[11] of the enol ether of the latter with subsequent dehydrobromination with calcium carbonate in dimethylformamide[11] gave 16α-methyl-6-dehydro-17α-acetoxyprogesterone (VII). Dehydrogenation of VI and VII with 2,3-dichloro-5,6-dicyanobenzoquinone[12] gave 16α-methyl-1-dehydro-17α-acetoxyprogesterone (VIII)[1] and 16α-methyl-1,6-*bis*dehydro-17α-acetoxyprogesterone (IX), respectively.

Whereas a large increase in antiinflammatory activity has been associated with the introduction of a C16-methyl group in the corticoid series[13], in no instance have we observed a pronounced increase in oral or subcutaneous progestational activity of the methylated progesterone over the corresponding desmethyl compound.

Zusammenfassung. Mehrere Derivate des 16α-Methylprogesteron wurden synthetisiert und biologisch geprüft. Die Einführung einer C16α-Methylgruppe ergab keine gesteigerte Progesteronaktivität in den getesteten Verbindungen.

S. Bernstein, E.W. Cantrall, J. P. Dusza, and J. P. Joseph

Organic Chemical Research Section, Lederle Laboratories' A Division of American Cyanamid Company, Pearl River (New York), June 6, 1961.

[7] A compound assigned this structure was first described by K. Heusler, J. Kebrle, C. Meystre, H. Ueberwasser, P. Wieland, G. Anner, and A. Wettstein, Helv. chim. Acta *42*, 2043 (1959), with m.p. 217–220°, λ_{max}^{EtOH} 242 mμ (ε 16600), $[\alpha]_D^{27.5} + 37.3°$ ($CHCl_3$). Our characterization of this compound differs from that of the Swiss group but is in good agreement with that reported by the Syntex group[1].

[8] J. A. Edwards, A. Zaffaroni, H. J. Ringold, and C. Djerassi, Proc. chem. Soc. *1959*, 87.

[9] 16α-Methyl-Reichstein's Substance S has also been prepared in this Laboratory from 16α-methylpregnenolone acetate[2] *via* the intermediate methyl 3β-hydroxy-16α-methylpregnadien-5,17(20)-dien-21-oate.

[10] A. Bowers and H. J. Ringold, J. Amer. chem. Soc. *80*, 3091 (1958).

[11] L. H. Knox, J. A. Zderic, J. Pérez Ruelas, C. Djerassi, and H. J. Ringold, J. Amer. chem. Soc. *82*, 1230 (1960).

[12] D. Burn, D. N. Kirk, and V. Petrow, Proc. chem. Soc. *1960*, 14.

[13] G. E. Arth, D. B. R. Johnston, J. Fried, W. W. Spooncer, D. R. Hoff, and L. H. Sarett, J. Amer. chem. Soc. 80, 3168 (1958). – E. P. Oliveto, R. Rausser, A. L. Nussbaum, W. Gebert, E. B. Hershberg, S. Tolksdorf, M. Eisler, P. L. Perlman, and M. M. Pechet, J. Amer. chem. Soc. *80*, 4428 (1958).

Structural Basis of Nucleolar Function

Due to the lack of a definite concept as to whether structure or function is basic to the study of biological organization of cells[1,2], an integrated approach is the accepted operational choice of biologists to-day. Accordingly, studies on structure and function are expected to proceed concurrently in a balanced sequence. Recently, some valuable contributions have been made on the (hetero)chromatin- nucleolus- protein synthesis relationships[3–7]. Curiously, however, the exquisite details of the fine structure of nucleolus are still lacking.

In the present study[8], some structural facets have been described by making a survey of extensive cytological changes that take place in the ophidian oocytes during their formation and development. The ophidian ovary was selected as being cytologically the least explored ovary. Moreover, the structural differentiation of the oocyte is perhaps the simplest. Yet, the biocytological processes cover a wide range of activities illustrative of cellular growth[9,10]. The study has revealed some architectural patterns peculiar to nucleolar function.

Nucleolar behaviour. A recounting of the chain of events during the formation and maturation of the oocytes would reveal some interesting features of nucleolar organization. The early oocytes may be distinguished by the possession of a prominent coiled spireme within the nucleus during the prophase stages. At these stages, there is no indication of the presence of nucleolus. Later, a single nucleolus makes its appearance enmeshed in a loose reticulum of achromatic strands in close association with the suspended chromatin material (Figure 1). Thus, in the early stages of its formation, the nucleolus appears homogeneous. It is negative to the Feulgen reaction and has, therefore, no indications of DNA constituents. In advanced oocytes, commensurate with the growth of the oocyte, the nucleolus grows to a considerable size and soon begins to bud off several smaller bodies. The budding process of the nucleolus is shown in Figures 2 and 3. This process of actual budding has rarely been described. The nucleolar derivatives are more or less of the same size. But exceptions to this may be found. The daughter nucleolar bodies come to lie near the nuclear membrane and are eventually extruded into the cytoplasm. In Figure 3, the much enlarged nucleolus is shown to be differentially stained. The central part is deeply stained while the outer part is lighter. This difference can be interpreted as due to variable concentrations of its constituent substances *or* to its duplex nature. Figures 2 and 3 also show in a clear manner the formation of daughter nucleolar bodies from the principal nucleolus, indicating that these daughter nucleolar bodies are not formed from any other source. The nucleolar organizers, which in earlier phases might be importantly concerned in the origination of nucleolus, do not seem visibly to participate in the formation of these nucleolar derivatives. There is no increase in the size of the nucleolar bodies after they reach the cytoplasm, neither do they multiply. They appear to be completely dissolved in the ooplasm without having directly transformed into any kind of yolk material. The extruded nucleolar bodies provide the cytological mechanism for the exchange of certain chemical substances from the nucleus to the cytoplasm (Figure 4). Presumably, these activating chemical

[1] T. M. Sonneborn, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. *46*, 149 (1960).

[2] L. Picken, *The Organization of Cells* (Oxford University Press, London 1960).

[3] H. Stich, Exper. *12*, 7 (1956).

[4] R. P. Perry and M. Errera, *The Cell Nucleus* (Butterworths, London 1960), p. 24.

[5] J. Brachet, *Biochemical Cytology* (Academic Press, New York 1957).

[6] T. Caspersson, *Cell Growth and Cell Function* (Norton, New York 1950).

[7] W. S. Vincent and E. Baltus, *The Cell Nucleus* (Butterworths, London 1960), p. 18.

[8] B. S. Kaushiva, Dissertation (University of Michigan, Microfilms 1949); Biological Abstracts *23*, 20256 (1949).

[9] D. Rudnick, *Cell Organism and Milieu.* 17th Symposium on Cells and their Environment. Society for the Study of Development and Growth (Ronald Press, New York 1959).

[10] J. Brachet, H. Chantrenne, and F. Vanderhaeghe, Biochim. biophys. Acta *18*, 544 (1955).

substances are essential for the elaboration of yolk material and in protein synthesis.

Functional significance. The main questions in connection with nucleolar function are: (1) the influence and role of 'nucleolar organizer'; (2) the function of nucleolus as a store-house or as an active seat of RNA synthesis; (3) the cytochemical heterogeneity of the nucleolus; and (4) the mode and significance of nucleo-cytoplasmic exchanges of nucleolar products. The structural evidences provided here are somewhat helpful in elucidation of some of these problems.

(1) *Nucleolar organizer.* The absence of nucleolus in early oocytes may, perhaps, provide an incipient evidence that in initial stages at least the origination and function of nucleolus is influenced by the closely associated chromatin. In later phases, however, independent centres of protein and RNA synthesis are established.

(2) *Active role.* The nucleolus undergoes active changes in form, size, and staining capacities. The actual process of nucleolar budding is shown in Figures 2 and 3, thereby indicating that the nucleolus is not merely a store-house of RNA but acts as an active seat of RNA and protein synthesis. The secondary nucleoli are extruded into the egg cytoplasm and provide the agency by which RNA from the nucleus is laid down into the cytoplasm. In the slug oocyte[11] also the secondary nucleoli represent independent centres of protein and RNA synthesis produced during the course of oocyte growth.

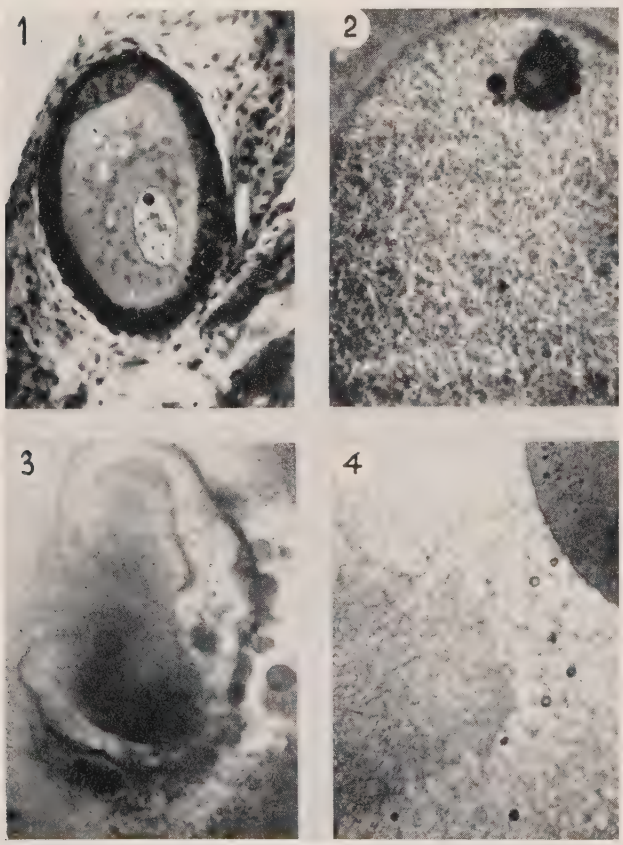


Fig. 1. Cocyte showing early nucleolus inside the nucleus (*Thamnophis ordinatus ordinatus*). Bouin, Mann's methyl blue eosin. ×140. Fig. 2. An advanced oocyte showing budding of the nucleolus inside the nucleus to form daughter nucleolar bodies (*Thamnophis ordinatus ordinatus*). Bouin, Harris alum hematoxylin. × 280. Fig. 3. The duplex principal nucleolus in the process of budding inside the nucleus of an advanced oocyte. Several nucleolar bodies are formed in the process (*Thamnophis ordinatus ordinatus*). Bouin, methylene blue eosin. × 630. Fig. 4. An advanced oocyte showing extrusion of the secondary nucleolar bodies from the nucleus into the cytoplasm (*Natrix piscator piscator*). Bouin, Mann's methyl blue eosin. × 140.

(3) *Heterogeneity.* The duplex structure of the principal nucleolus is shown in Figure 3. The heterogeneity may be due to the non-homogeneous distribution of RNA. The less intensely stained outer portion indicating a lower concentration of RNA. Another possibility could be the differences in the mechanism by which the dye attaches to two possible types of RNA. LOGAN and DAVIDSON[12] have designated a nuclear RNA_1 and RNA_2 based on differential solubility.

Recently, the growth of the slug oocyte has been studied cytochemically[11] with respect to DNA, RNA, histones, basic proteins, mucopolysaccharides, and phospholipids. It has been found that the two classes of nucleoli found in the oocyte nuclei are of different chemical composition.

(4) *Nucleo-cytoplasmic interchanges.* It seems that the extrusion of nucleolar bodies rich in RNA provides a means for the transfer of the nucleic acids from the nucleus into the cytoplasm for protein synthesis. If this be true, the extrusion of the daughter nucleoli is a very significant process because, through these nucleolar bodies, protein or protein precursors are discharged into the cytoplasm. The present work provides direct structural evidence to show that there is an exchange of materials between the nucleus and the cytoplasm, but the nature and role of the extruded materials need to be further investigated. The passage of RNA from the nucleus to the cytoplasm in amoeba[13] has also been reported. It is reasonably certain that the microsomal RNA-protein particles are major sites of protein synthesis[6]. But there is as yet no explanation of how this function is geared to nuclear and cytoplasmic physiology.

The highly specific effects exerted by the nucleus on the cytoplasm are generally thought to be mediated by means of the RNA. There is clearly a requirement for RNA in the cytoplasmic synthesis of protein. RNA is synthesized most actively in the nucleolus, and can pass to the cytoplasm. However, it remains uncertain whether some RNA is synthesized in the cytoplasm also. Recent experiments with nuclear transplantation in amoeba[14] suggest that specific protein synthesis occurs in the nucleus. These interesting results demonstrate that some protein of the nucleus is transferred to the cytoplasm and then back to the nucleus. Earlier studies on enucleated cells have shown that protein synthesis is reduced in the absence of the nucleus, indicating that at least some protein synthesizing ability is immediately dependent upon the presence of the nucleus. The consensus of recent literature[15] is that both the nucleus and cytoplasm carry on protein synthesis.

Zusammenfassung. Es scheint ein fundamentaler Zusammenhang zwischen Struktur und Funktion des Nukleolus vorhanden zu sein. Die Spätphase des Hauptnukleolus hat eine Doppelstruktur. Die beobachtete Nukleolusvermehrung zeigt, dass der Nukleolus ein aktives Gebiet für RNS und Proteinsynthese ist. Die Übertragung der Nukleolusstoffe vom Kern ins Cytoplasma wird diskutiert.

B. S. KAUSHIVA

Central Drug Research Institute, Lucknow (India), April 4, 1961.

[11] R. R. COWDEN, *Symposium on the Chemical Basis of Development* (Johns Hopkins Press, Baltimore 1958), p. 404.
[12] R. LOGAN and J. N. DAVIDSON, Biochim. biophys. Acta *24*, 24 (1957).
[13] L. GOLDSTEIN and W. PLANT, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. *40*, 874 (1955).
[14] L. GOLDSTEIN, Exp. Cell Res. *15*, 635 (1958).
[15] D. M. PRESCOTT, Ann. Rev. Physiol. *20*, 17 (1960).

Mechanisms of Transfer between Environment and Cell

In a recent publication, ASCHHEIM[1] astonished himself by rediscovering the fact that adsorption of the Langmuir type is formally analogous to the conventional treatment of single-step enzyme reactions. He seems unaware that this was first pointed out by HALDANE[2], that a simple adsorption-carrier model was considered by REINER in 1939[3], that the analogy was proved and discussed by REINER in 1959[4] and pointed out in the same year by EDSALL and WYMAN[5]. ASCHHEIM also overlooks a large body of pertinent experimental work, such as has come from studies with bacteria[6,7].

ASCHHEIM's conclusion that active transport is due to adsorption on intracellular sites is a complete *non sequitur*. If the formal properties of two mechanisms are identical, it is obviously impossible to decide which mechanism holds merely by comparing data with the algebraic relations. On the same grounds, of course, the alternatives rejected by ASCHHEIM get no support from such a comparison.

This does not mean that no conclusions at all can be drawn from properly arranged kinetic data. We are dealing with a system of at least two phases, with perhaps a third if we count the cell surface. Ignoring for the moment a true enzymatic mechanism, we have three possibilities: (1) adsorption on the cell surface only; (2) adsorption inside the cell after entrance by diffusion; and (3) entrance into the cell by a carrier.

(1) Denoting the total adsorbent by A_t and extracellular concentration of the substance to be bound by S_e, the steady-state (and also maximum) value for material bound (by Langmuir adsorption) is $C_m = A_t S_e/(S_e + K)$, where $K = k_{-1}/k_1$ is the dissociation constant of the adsorption complex. The increase in bound material with time is determined by the differential equation $dC/dt = k_1 S_e(A_t - C) - k_{-1} C$. We can solve this and get $C = C_m\{1 - \exp[-(k_1 S_e + k_{-1})\, t]\}$. It is understood here that S_e is independent of time (maintained constant by some experimental device).

(2) If internal adsorption occurs after diffusion across the cell surface, we denote the internal free compound by S_i, the other components as before. The rate of penetration by diffusion across the surface[8] is $h_1 S_e - h_2 S_i$. In the complete steady state, we have therefore $C_m = A_t S_i/(S_i + K)$, and $S_i = HS_e$, where $H = h_1/h_2$ is the ratio of the permeability coefficients. Hence we can write $C_m = A_t S_e/(S_e + K/H)$. The total material taken up is $C_m + S_i$. If we assume that the carrier is almost always in the steady state, and follow the time course as S_i approaches its maximum value, we have $S_i = HS_e(1 - e^{-h_2 t})$, while C_m is as before.

(3) Let the total carrier concentration be A_t. The carrier complex C is formed and broken with rate constants k_1 and k_{-1}, and the complex releases free material intracellularly (S_i) at the rate $k_2 C$. The free S_i may also leak out of the cell at the rate hS_i. In the steady state, $C_m = A_t S_e/(S_e + K)$, and $S_i = K' C_m$, where $K' = k_2/h$. The total material taken up is $C_m + S_i = (K' + 1)\, C_m$. If we let carrier be always in the steady state, and follow the time development of free material S_i, we get $S_i = K' C_m(1 - e^{-ht})$, with C_m as before.

If we compare these results for the steady state, we see that surface adsorption still follows a Langmuir isotherm. On the other hand, internal adsorption after penetration by diffusion has an extra term that is linear in S_e. This term will be small if the penetration rate is small (small H); but the hyperbolic term will also decrease with H, unless K is very small or A_t very large. Thus one would expect, in experiments with increasing external concentrations, to find a concentration curve for uptake that starts like a hyperbola but, instead of levelling off completely, approaches a straight line with slope H. In the carrier case, the Langmuir isotherm form will again occur.

Further information, however, comes from time experiments. All cases approach maximum uptake more or less exponentially. But the curve for surface adsorption can be written as $\ln(1 - C/C_m) = -(k_1 S_e + k_{-1})\, t$ in order to get the value of the coefficient of t in the exponent; this coefficient is a measure of the rate at which the steady value is approached. The equation shows that this will be linear in S_e, not a constant. The time equation for intracellular adsorption is more complex, but the comparison is possible with a simple trick. Writing U for the total uptake,

$$U = (1 - e^{-h_2 t})\, \{H S_e + A_t H S_e/[K + H S_e(1 - e^{-h_2 t})]\}\,.$$

The slope of the U vs t curve is

$$dU/dt = e^{-h_2 t}\{H S_e h_2 + K A_t H S_e h_2/[K + H S_e(1 - e^{-h_2 t})]^2\}\,.$$

In this expression, the term in square brackets will approach $(K + H S_e)^2$ with increasing time; thus $\ln(dU/dt)$ will approach const. $- h_2 t$. The corresponding function for the surface adsorption case, $\ln(dC/dt)$, will approach const. $-(k_1 S_e + k_{-1})\, t$. Thus, if we plot $\ln(dC/dt)$ or $\ln(dU/dt)$ respectively against time, the limiting slope will be dependent on S_e in the one case, independent in the other. As for the carrier case, it will have a unique property, since $U = C_m[K'(1 - e^{-ht}) + 1]$: the U — t curve, carefully extrapolated back to $t = 0$, will not approach a zero value, but the finite value C_m. This intercept may of course be difficult to detect if A_t is very small while K' is very large. Even in this case, the discrimination is possible: we will have $dU/dt = K' C_m h e^{-ht}$, which will have a linear plot of $\ln(dU/dt)$ against t just like the surface adsorption case, but with a slope independent of S_e, whereas the corresponding plot for intracellular adsorption will be curved, and only approach a straight line for sufficiently large values of t.

Combinations of mechanisms might occur: e.g., a surface carrier mechanism followed by internal adsorption. There is a novel feature in the steady state. The maximum value for internally bound material will be

$$C_m = A_t B_t K' S_e/[K_a K_b + (K_b + K' A_t)\, S_e]\,,$$

where A_t is the amount of surface carrier and B_t that of internal adsorbent. Since these quantities, in an experiment with a mass of tissue or a cell suspension, would be proportional to the tissue mass, uptake will no longer be proportional to tissue mass as in the cases previously considered, but will vary with mass M as $a M^2/(b M + c)$.

Résumé. Un essai de choix entre plusieurs mécanismes théoriques du transport actif dans les cellules, dans des conditions d'équilibre de flux, n'apparaît pas satisfaisant à la lumière de cette étude. Des analyses cinétiques capables de constituer les séparations désirées entre ces mécanismes sont présentées.

J. M. REINER

Department of Microbiology, Emory University, Atlanta (Georgia), May 24, 1961.

1 E. ASCHHEIM, Exper. *16*, 305 (1960).
2 J. B. S. HALDANE, *Enzymes* (Longmans Green, London 1930).
3 J. M. REINER, Bull. Math. Biophys. *1*, 143 (1939).
4 J. M. REINER, *Behaviour of Enzyme Systems* (Burgess Publishing Co., Minneapolis 1959).
5 J. T. EDSALL and J. WYMAN, *Biophysical Chemistry*, vol. 1 (Academic Press, New York 1958).
6 G. N. COHEN and J. MONOD, Bact. Revs. *21*, 169 (1957).
7 P. MITCHELL and J. MOYLE, Proc. Roy. Phys. Soc. (Edinb.) *28*, 19 (1960).
8 J. M. REINER, Phil. Sci. *8*, 105 (1943).

Mesodermal and Endodermal Differentiation of the Presumptive Ectoderm of *Triturus* Gastrula through Influence of Lithium Ion[1]

Since the finding of HERBST[2], LiCl has been proved to have the peculiar effect of modifying the embryonic development in some animals. In sea urchin embryos this chemical is known to act mainly on the animal half of the egg to cause transformation of the presumptive ectoderm into the endomesodermal tissues[3,4]. On the other hand, in amphibian embryos the effect of the chemical has been recognized to be the bringing-about of malformation of the nervous and sensory organs together with defect of the axial mesoderm[5]. Recently, however, the author[6,7] and ŌGI[8] have shown that the gastrular ectoderm of *Triturus pyrrhogaster*, treated with LiCl, undergoes not only neural but also mesodermal differentiations in response to those inductors which normally evoke only the neuralization of ectoderm, such as living prechordal plate, heat-killed organizer or guinea-pig liver. From this fact it can easily be assumed that in amphibian embryos, similarly as in sea urchins, the effect of Li ion is to affect the differentiation of presumptive ectoderm to give rise to meso- and endodermal differentiations. In order to get further evidences corroborating this view, the following experiments were undertaken.

Throughout the experiments, explantation was carried out with pieces of the presumptive ectoderm taken from the animal pole of early gastrulae of *Triturus pyrrhogaster*. In the first experiment, the ectoderm excised was immersed, before explantation, in 0.06 *M* LiCl solution of different pH value for 3.5 to 4.0 h. The pH was adjusted ranging from 7.0 to 9.8 by adding a small quantity of Li_2CO_3 to the solution. As control, the ectoderm was explanted after treatment with 0.06 *M* NaCl solution of the same range of pH value. In this case the adjustment of pH was made with Na_2CO_3. In the second experiment, the ectoderm was exposed to an ammonia solution of pH 11.8 to 12.0 for 2 to 6 min after treatment with Li-solution at pH 7.0, and then explanted. All the procedures were carried out at room temperature ranging from 23.5° to 26.5°C. Cultivation of the explants was done in Holtfreter's solution at 18°C for 2 to 5 weeks.

In the treatment with Na-solution disaggregation of the ectoderm always took place, whereas in the case of Li-treatment it occurred only when pH of the solution was above 9.2. But in either case reaggregation of the treated tissue was brought about by transferring the tissue into Holtfreter's solution. Generally the explants showed good differentiation, but quality of the tissues differentiated in the explants was different between Li- and Na-treatments as is seen in Table I. In the Li-treatments neural tissue was found and various kinds of mesodermal tissues (Figure 1, 2, 3, and 4) and sometimes endodermal tissue of gut-like appearance (Figure 5). On the other hand, in the treatments with Na-solution, neural tissue alone was found to be produced only when the pH value of the solution was above 9.2. Neither mesodermal nor endodermal differentiation was seen in this case. Further, it was noted that in the case of Li-treatments a tendency was found in which frequency and quality of the mesodermal tissues produced varied with change of the pH value of Li-solution. As seen in Table I, frequency of the mesodermal differentiation showed marked increase with rise of the pH, and at the same time notochord and somite became more frequently found than pronephros and blood cells. From this result, it seems likely that Li ion acts upon the presumptive ectoderm to cause meso- and endodermal differentiations, but the effect is modified by changing pH value of the medium.

On the other hand, double treatment of the ectode with Li-solution and ammonia gave a result compara to that of the Li-treatment at higher pH values (Table I Whereas the treatment with Li-solution alone broug about mesodermal differentiation only rarely, additio treatment with ammonia was followed by freque production of not only notochord and somite but a endodermal tissue. Although it is a well-established fa that treatment of the ectoderm with alkaline soluti brings about differentiation of the neural and mesenchym tissues, no case has been found in which definitive me dermal tissues are developed by the same treatment[9] Therefore, we are inclined to consider that OH ion e hances the effect of Li ion upon the presumptive ectode of gastrula which elicits mesodermal and endoderm differentiations.

Tab. I. Differentiation of the explants treated with 0.06 *M* LiCl NaCl at different pH.

pH	LiCl				NaCl			
	6.8 – 7.0	8.0 – 8.2	9.2 – 9.4	9.6 – 9.8	6.8 – 7.0	8.0 – 8.2	9.2 – 9.4	9
Available case	93	68	11	9	72	30	10	
Neural tissue	–	–	5	7	–	–	4	
Mesenchyme	9	37	2	–			–	
Mesodermal tissue (total)	1 (1%)	16 (24%)	5 (45%)	7 (78%)	–	–	–	
Blood	1	1	–	–	–	–	–	
Pronephros	–	4	–	–	–	–	–	
Somite	–	13	5	7	–	–	–	
Notochord	–	–	5	6	–	–	–	
Endodermal tissue (total)	29 (31%)	18 (26%)	3 (27%)	1 (11%)	–	–	–	

Tab. II. Differentiation of the explants treated with ammo solution after the treatment with 0.06 *M* LiCl of pH 7.0

	Ammonia-treatment alone	Li-treatment alone	Li- plus ammoni treatme
Available case	37	93	30
Neural tissue	22	–	10
Mesenchyme	3	9	5
Mesodermal tissue (total)	–	1 (1%)	6 (20%)
Blood	–	1	–
Pronephros	–	–	–
Somite	–	–	6
Notochord	–	–	2
Endodermal tissue	–	29 (31%)	13 (43%)

[1] This work was supported by a scientific grant of the Ministry Education of Japan.

[2] C. HERBST, Roux' Arch. Entw.-mech. *2*, 455 (1896).
[3] L. v. UBISCH, Roux' Arch. Entw.-mech. *117*, 80 (1929).
[4] S. HÖRSTADIUS, Roux' Arch. Entw.-mech. *135*, 1 (1936).
[5] F. E. LEHMANN, *Einführung in die physiologische Embryolog* (1945).
[6] Y. MASUI, Annot. Zool. Japon. *32*, 23 (1959).
[7] Y. MASUI, Mem. Kōnan Univ. Sci. Ser. *4*, 79 (1960).
[8] K. ŌGI, Embryologia *5*, 381 (1961).
[9] J. HOLTFRETER, J. exp. Zool. *106*, 197 (1947).
[10] T. YAMADA, Biol. Bull. *98*, 98 (1950).

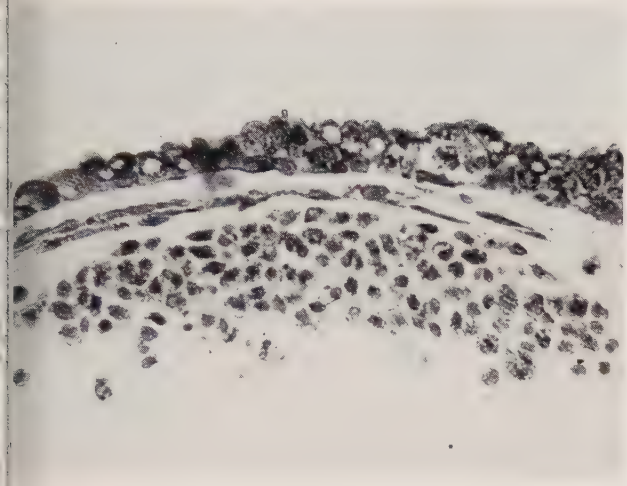


Fig. 1. Blood cells differentiated in Li-explant treated at pH 7.0 for 4 h.

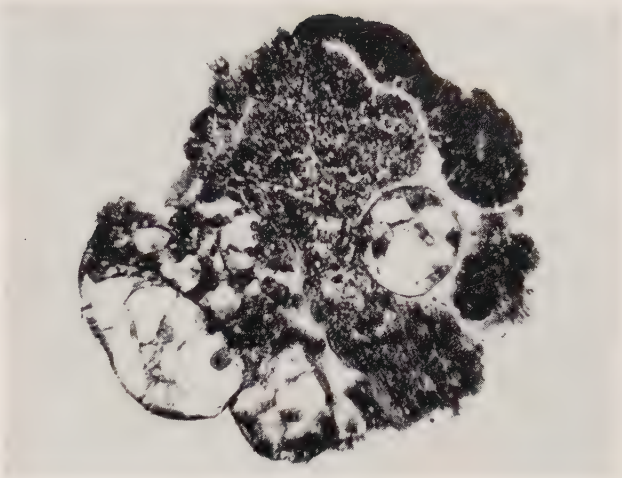


Fig. 4. Notochord and neural tissue differentiated in Li-explant treated at pH 9.8 for 3.5 h.

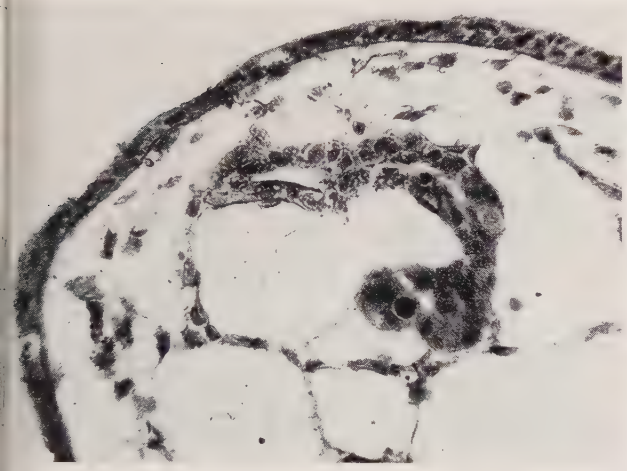


Fig. 2. Pronephric tubules differentiated in Li-explant treated at pH 8.2 for 4 h.

Fig. 5. Endodermal tissue of gut-like structure differentiated in Li-explant treated at pH 8.2 for 4 h.

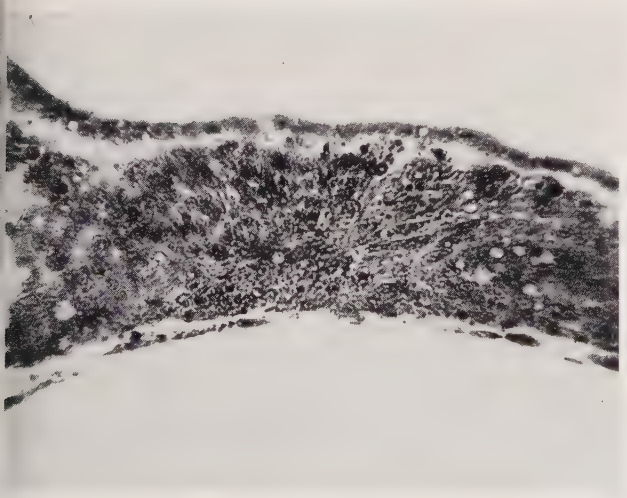


Fig. 3. Muscle differentiated in Li-explant treated at pH 8.2 for 4 h.

Zusammenfassung. Stücke des präsumptiven Ektoderms der jungen Gastrula von *Triturus pyrrhogaster* wurden nach 4stündiger Behandlung mit 0,06 *M* LiCl-Lösung explantiert. Das pH wurde durch Zusatz von Li_2CO_3 auf 7.0 bis 9.8 eingestellt. Die Explantate, die bei pH 9,2 oder 9,8 behandelt wurden, differenzierten sich in zunehmender Häufigkeit neben Neuralgewebe zu Chorda und Muskulatur. Bei Behandlung mit LiCl-Lösungen von pH 7,0 und 8,0 wurden nur Blutzellen, Vornierenkanälchen oder Muskulatur in geringem Prozentsatz produziert, jedoch weder Neuralgewebe noch Chorda. Diese Explantate ergaben aber Differenzierungen von Chorda und Neuralgewebe, wenn sie nach der Li-Behandlung kurz einer Ammoniak-Lösung von pH 12,0 ausgesetzt wurden.

Yoshio Masui

Department of Biology, Faculty of Science, Kōnan University, Kōbe (Japan), June 20, 1961.

Observations upon the Mast Cells of Rat Foetal Tissues

In 1953 Riley and West[1] drew attention to a strong positive correlation between the histamine and mast cell content of a variety of normal and pathological tissues and noted that all their evidence suggested that tissue mast cells are rich in histamine. Dixon[2] also observed close correlation between the mast cell count and the histamine content in the skin of rats from $18^1/_2$ days gestation until the 7th day *post partum* but showed that histamine may be present in other tissues several days before the first appearance of mast cells in those tissues. For example, she found histamine in whole foetus extracts as early as the 11th day of gestation although Holmgren[3], to whom she referred, had found no mast cells in foetuses less than 14 mm in length (ca. 16th day of gestation). Kahlson, Rosengren, and White[4], who appear also to have relied upon Holmgren's histological findings, state that histamine may first be detected on the 9th day of gestation and noted that foetal liver is a richer source of histamine than even a dog mastocytoma. They emphasized, however, that little histamine is found in foetal tissues, whose actual content of histamine is never very high.

A wider survey of the histological literature reveals a number of reports in which the first appearance of subcutaneous mast cells corresponds reasonably well with Holmgren's findings; Maximow[5] in 11 mm foetus; Alfejew[6] in 13 mm foetus: Arvy[7] in foetus of 16th day of gestation (for a comparison of foetal length and age, see Donaldson[8]). Laguesse[9] and Webb[10], however, first found subcutaneous mast cells a short time before birth and on the 19th day of gestation (although this was equated with 5 days before normal delivery) respectively.

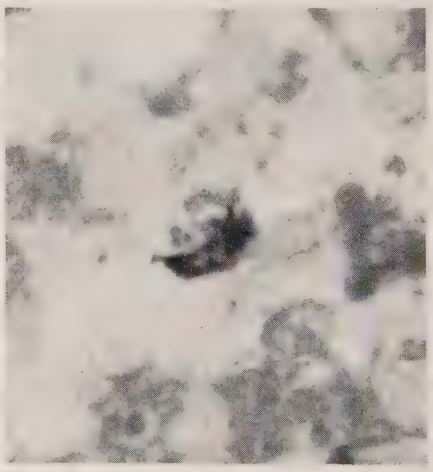
The first appearance of mast cells in more deeply situated connective tissue and in certain viscera is more variously reported. Maximow[5] found them in the liver, the spleen and, indeed, in any organ which he studied in stages later than the 11 mm foetus; these stages were not specified. Alfejew[6] was more explicit in her report. By the 17 mm stage mast cells were present in the spleen and in deep connective tissue between muscles, around joints, in the mediastinum and between abdominal viscera. By the 28 mm stage they were present also in the mucosa of the stomach and in developing lymph nodes. Urtubey[11] reported juvenilelike mast cells as first appearing 'en plein mesenchyme' of the 12 mm rat embryo. There are, then, discrepancies between these authors' reports and Holmgren's; the latter found mast cells in tissues other than subcutaneous only in foetuses approaching 30 mm in length.

Despite the extensive evidence that the mast cells of the adult rat are rich in histamine it is not claimed that mast cells are the only source of histamine in the tissues[12]. It seems certain that they store histamine and can release it when suitably stimulated; their absence from histamine-rich foetal tissues might merely indicate that they have yet to assume their adult role. The discrepancies in the histological accounts of foetal tissues, however, remain and have seemed worthy of some investigation.

Foetuses for study were obtained by crossing Holtzman females with Wistar males. Mating was confirmed by vaginal smear and any pregnancy resulting was considered to begin in the middle of the night concerned. 26 foetuses were examined histologically for mast cells. 17 of these ($14^1/_2$, 15(X2), $15^1/_2$ (X4), $16^1/_2$ (X6), $18^1/_2$ (X2), and 20 (X2) days of gestation) were fixed in 10% formalin and stained with Mallory's methylene blue after paraffin sectioning. 9 ($14^1/_2$ (X5) and 15 (X4) days of gestation) were fixed and stained by the method of Smith and Atkinson[13]. Litter mates of these foetuses were measur for C. R. length and although small variations were not between siblings, the lengths corresponded closely wi the age/length table given by Donaldson[8].

The only criterion for the identification of tissue ma cells appears to be the presence of metachromatica staining granules in the cytoplasm of otherwise undisti guished cells and this criterion was used. In some cells t granulation was sparse so that it was possible to make o a pale, central, granule-free zone which, presumabl corresponded with the nucleus. In most cells containi metachromatic granules, however, the granulation was dense as to obscure the nuclear region.

In the six foetuses of $14^1/_2$ days gestation, treated either of the histological techniques, no mast cells we seen. Nor were any seen in the formalin/methylene bl foetuses of 15 days gestation. In three of the four 15 da gestation foetuses treated by the method of Smith ar Atkinson, and in all the older foetuses ($15^1/_2$–20 da gestation) mast cells were present in the subcutaneo connective tissue. In the 15 days specimens, mast ce granulation was slight and the cells rather sparse scattered but by $15^1/_2$ days of gestation typically granul rich mast cells were present and, in places, quite nume ous. In one $15^1/_2$ days gestation specimen a few typic mast cells were found in the liver (Figure), and liver ma cells were found in all the older foetuses. The number mast cells in the liver was not large at any stage, but w perhaps constant relative to the bulk of the liver itse By $16^1/_2$ days of gestation mast cells were constant found in the deep connective tissues, including the mese



Mast cell in liver of $15^1/_2$ day rat foetus (× 1700).

[1] J. F. Riley and G. B. West, J. Physiol. *120*, 528 (1953).
[2] Joan B. Dixon, J. Physiol. *147*, 144 (1959).
[3] H. J. Holmgren, Acta anat. *2*, 40 (1946).
[4] G. Kahlson, Elsa Rosengren, and T. White, J. Physiol. *151* 131 (1960).
[5] A. Maximow, Folia haematol. *4*, 611 (1907).
[6] Sophia Alfejew, Folia haematol. (Lpz.) *30*, 111 (1924).
[7] L. Arvy, C. R. Ass. Anat. xliii Réunion, 165 (1956).
[8] H. H. Donaldson, *The Rat*, 2nd Ed., American Anatomical Memoirs, Wistar Institute (Philadelphia 1924).
[9] E. Laguesse, C. R. Soc. Biol. *82*, 1415 (1919).
[10] R. L. Webb, Anat. Rec. *64* (Suppl. 4), 55 (1936).
[11] L. Urtubey, Bull. Histol. appl. A, La Physiol. *25*, 151 (1948).
[12] J. F. Riley, *The Mast Cells* (E. & S. Livingstone Ltd., Edinburgh and London 1959).
[13] E. W. Smith and W. B. Atkinson, Science *123*, 941 (1956).

eries of three of the six specimens studied. By $18^1/_2$ days of gestation mast cells were more numerous in all the issues mentioned and a few were also present in the substance of somatic muscles. In the oldest foetuses studied ($20^1/_2$ days of gestation) mast cells were very numerous in he mesenteries, especially in relation to blood vessels, and n all connective tissue. A few were also found in the ndoneurium of the nerves to the extrinsic ocular muscles.

Blood mast cells were not seen in any of the foetuses tudied (unless those found constantly in the liver fall into hat category), and a tendency for mast cells to lie close to lood vessels was noted only in relation to the mesenteric nast cells of the oldest ($20^1/_2$ day) foetuses.

The present observations approximate quite closely to hose of ALFEJEW[6] and do not contradict MAXIMOW's[5]. t is clear that mast cells are much more widely distributed n rat foetal tissues in specimens between 17 and 28 mm ong (say $15^1/_2$–$20^1/_2$ days gestation) than HOLMGREN has eported, or than DIXON[2] and KAHLSON et al.[4] (relying nly upon HOLMGREN's report) had supposed. It is qually clear, however, that histamine is first present in at foetal tissues some four or five days before mast cells nay be recognized there and that the source of this histmine, while still unknown, is in cells other than mast cells.

In view of the report by BENDITT, WONG, ARASE, and ROEPER[14] that serotonin occurs in mast cells obtained rom rat peritoneal washings there might seem to be some orrelation between DIXON's report that 5-Hydroxytryptamine is first detectable in the foetus of $15^1/_2$ days gestation and our own finding of the earliest mast cells in the subcutaneous connective tissues of foetuses of the same age. However, since PARRAT and WEST[15] have apparently been unable to confirm that serotonin occurs in the mast cells of adult rat skin, the possibility of morphologically identical mast cells having various biochemical potentials must be considered, as well as the idea that the developing mast cells may shift their roles as the surrounding tissue alters with maturation. In spite of these considerations, the interrelationship between foetal serotonin and mast cells may be more apparent than real.

Résumé. Dans les études physiologiques récentes, il est dit que l'histamine foetale se montre plusieurs jours avant l'apparition des mastocytes dans les tissus foetaux. Le présent travail démontre que les mastocytes apparaissent plus tôt et sont plus répandus qu'on ne le supposait. Ces constatations confirment d'anciennes observations apparemment oubliées.

H. J. GAMBLE and J. G. STEMPAK

Department of Anatomy, College of Medicine, University of Illinois, Chicago, May 15, 1961.

[14] E. P. BENDITT, R. L. WONG, M. ARASE, and E. ROEPER, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *90*, 303 (1955).
[15] J. R. PARRAT and G. B. WEST, J. Physiol. *134*, 169 (1954).

Zur Nahrungsaufnahme von *Megoura viciae* Buckt., einer phloemsaugenden Aphide (*Homoptera, Rhynchota*)

Die Tracer-Methode ist vorzüglich geeignet, Untersuchungen am Saugakt und zur Nahrungsaufnahme pflanzensaugender Insekten durchzuführen. So liegen speziell über phloemsaugende Aphiden mehrere Arbeiten vor[1–7]. In allen Fällen wurde die Wirtspflanze mit P^{32} markiert und nach dem Saugen der Läuse deren Radioaktivität gemessen. Auf diese Weise wurden Probleme des wechselseitigen Verhältnisses Wirtspflanze und Insekt bearbeitet, vor allem auch im Hinblick auf den Übertragungsmechanismus phytopathogener Viren.

Vorliegende Untersuchungen befassen sich speziell mit dem Problem der Nahrungsaufnahme bei einem Phloemsauger. Dabei stehen drei Fragen im Vordergrund: (1) Wann erreichen die Läuse mit ihren Stechborsten das Phloem? (2) Nehmen die Tiere auch ausserhalb des Phloems Nahrung auf? (3) Wie verläuft die Nahrungsaufnahme in Abhängigkeit von der Zeit? Daneben ergaben sich beim Experimentieren noch andere interessante Fragen, wie im folgenden noch näher ausgeführt wird.

Junge, etwa 15 cm hohe *Vicia faba*-Pflanzen wurden mit den Wurzeln in phosphatfreie Knoopsche Nährlösung gestellt, der markiertes Phosphat zugesetzt war. Die spezifische Aktivität der Lösung betrug 0,3 mC/ml. Die apteren Virgines von *Megoura viciae* erwiesen sich besonders wegen ihrer Grösse für die Versuche als gut geeignet, da die Läuse jeweils einzeln gut beobachtet und nach Aufnahme des Tracers gemessen werden konnten. Es wurde hier also nicht, wie meist üblich, mit Gruppen von Versuchstieren gearbeitet, denn diese Methode kann, wie aus den Ergebnissen deutlich wird, sehr leicht zu fehlerhaften Resultaten führen. Die zu den Versuchen verwendeten Tiere waren stets «Saugtiere», das heisst, sie wurden unmittelbar, ohne Hungerperiode, von der nicht radioaktiven Pflanze auf die markierte Versuchspflanze gebracht. Diese Tiere stechen nämlich sehr bald nach der Übertragung wieder an und wechseln ihren Saugort viel seltener als «Hungertiere», die vor dem endgültigen Anstich erst zahlreiche kurzdauernde Probestiche ausführen. Die von den Tieren aufgenommene Aktivität wurde unter Korrektur des Nullwertes und physikalischen Abfalls genügend lange gemessen.

Allen *Aphididae* ist ein typisches Saugverhalten gemeinsam. Der Anstich erfolgt durch senkrechtes Aufsetzen des Labiums auf die pflanzliche Epidermis und daran anschliessendes, äusserlich nicht mehr sichtbares Vordringen der Stechborsten in das Innere der Pflanze. Dabei werden die Antennen der Laus langsam nach hinten geklappt, so dass sie schliesslich fast dem Abdomen anliegen[8,9]. Der Beginn des Anstichs ist auch bei *Megoura viciae* äusserlich gut sichtbar. Je 30 bis 60 Läuse wurden in dieser Saughaltung über 1, 3, 5, 7, 10, 20 min usw. auf der markierten Pflanze einzeln beobachtet, nach der entsprechenden Zeit entfernt und ihre Aktivität gemessen.

In Übereinstimmung mit Untersuchungen an *Aphis fabae* Scop.[4] ergab sich, dass in den ersten Minuten nach Beginn des Anstichs keinerlei messbare Aktivität aufgenommen wird. Erst nach 7 min können die Läuse radioaktiv werden, und danach steigt die von ihnen inkorporierte Aktivität sprunghaft an. Es darf also mit Sicherheit angenommen werden, dass die Läuse bereits nach 7 min

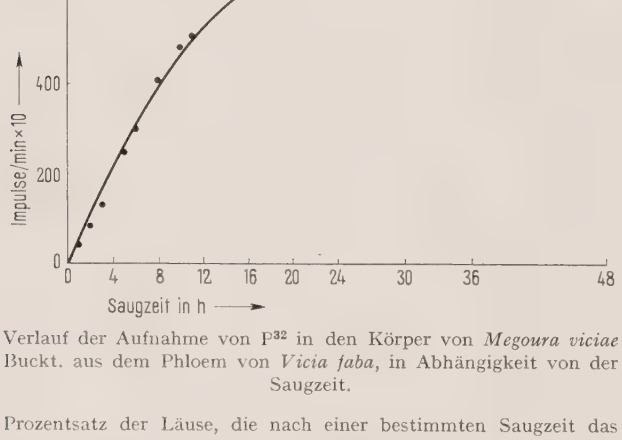
[1] M. F. DAY und H. IRZYKIEWICZ, Austr. J. Biol. Sci. B *6*, 98 (1953).
[2] M. A. WATSON und H. L. NIXON, Ann. appl. Biol. *40*, 537 (1953).
[3] C. J. BANKS und H. L. NIXON, Entomol. exp. appl. *2*, 77 (1959).
[4] E. HENNIG, Naturw. *46*, 410 (1959).
[5] W. KLOFT, Z. angew. Ent. *45*, 337; *46*, 42 (1960).
[6] W. KLOFT und H. KUNKEL, Proc. XI. Intern. Congr. Ent. (Wien 1960).
[7] W. KLOFT und P. EHRHARDT, Proc. Symp. *Radioisotopes and Radiation in Entomology* of the IAEA (Bombay 1960), im Druck.
[8] H. A. VAN HOOF, Med. no. 161 Lab. Ent. Wageningen (1958).
[9] J. MAREK, Diss. (Würzburg 1959).

das Phloem erreicht haben können und nur dort ihre Nahrung aufnehmen. Bei Läusen mit kürzeren Saugzeiten als 7 min, ebenso bei Hungertieren nach den Probestichen, liess sich auch mit der empfindlicheren autoradiographischen Methode keinerlei Aktivität im Rüssel oder Körper der Tiere nachweisen, so dass eine Aufnahme von Stoffen im Parenchym wohl ausscheidet. Dies wäre bei der fast ausschliesslich interzellularen Stechweise der Laus im Parenchym auch schwer zu erklären.

Es erreichen jedoch bei weitem nicht alle Versuchstiere in diesen 7 min das Phloem, sondern nur ein geringer Prozentsatz. Einzelheiten gehen aus der Tabelle hervor.

Erst nach rund 3 h haben also nahezu alle Läuse ihr Ziel erreicht. Läuse, die vor Ende der jeweiligen Versuchsdauer selbständig ihren Saugplatz verliessen, waren in keinem Fall aktiv geworden, hatten also das Phloem nicht erreicht. Auf Grund obiger Werte darf man wohl annehmen, dass die Läuse das Phloem keineswegs gezielt anstechen, sonst wäre die grosse Variabilität in der Zeit, die zum Erreichen des Phloems notwendig ist (7 min bis 5 h), schwer erklärbar. Ein gerichteter Anstich, etwa auf Grund chemischer Reize im Parenchym, scheidet also vermutlich aus. Es entsteht vielmehr der Eindruck, dass es vom Zufall abhängt, ob bzw. wann die Stechborsten der Läuse ihr Ziel erreichen, wobei die Wahrscheinlichkeit des Erfolges je nach der Lage des Phloems im pflanzlichen Gewebe und je nach besogenem Pflanzenteil bei den verschiedensten Wirtspflanzen sicher sehr unterschiedlich sein kann. Eine interessante Ergänzung dieser Befunde bilden die Ergebnisse, die auf Grund histologischer Untersuchungen an der Speichelscheide von *Myzus persicae* (Sulz.) gewonnen wurden[10].

Lässt man *Megoura viciae* auf einer markierten Pflanze anstechen, die nicht zu ihren Wirtspflanzen zählt (*Allium schoenoprasum* L. und *Poa pratensis* L. wurden hier verwendet), so ergeben sich zunächst die gleichen Verhältnisse wie an *Vicia faba*. Vor Erreichen des Phloems ist bei den Läusen keine Aktivität messbar, erst danach steigt sie sprunghaft an. Die Läuse bleiben nun jedoch nicht länger auf der ihnen fremden Pflanze, sondern verlassen sie und stechen nicht mehr an. Ihre Aktivität ist vergleichsweise so gross wie die einer Laus, welche auf *Vicia faba* 10 bis 20 min im Phloem gesaugt hat. Offensichtlich können die Läuse erst nach Erreichen des Phloems, vielleicht mit Hilfe des epipharyngealen Geschmacksorgans die Eignung einer Pflanze als Nahrungsquelle erkennen. Möglicherweise spielt sich dieser Vorgang in der Natur ganz allgemein bei der Suche nach der Wirtspflanze ab. Dabei ist der Ausdruck «Probesaugen» in diesem Falle durchaus gerechtfertigt, da tatsächlich Nahrung aufgenommen wird. Im Gegensatz hierzu steht der kurzdauernde Anstich, insbesondere von Hungertieren vor dem endgültigen Anstich, bei welchem keine Nahrung aufgenommen wird und der daher wohl besser als «Probestich» zu bezeichnen ist.



Verlauf der Aufnahme von P^{32} in den Körper von *Megoura viciae* Buckt. aus dem Phloem von *Vicia faba*, in Abhängigkeit von der Saugzeit.

Prozentsatz der Läuse, die nach einer bestimmten Saugzeit das Phloem von *Vicia faba* erreicht haben

Zeit in min	1	3	5	7	10	20	30	40	60	120	180	300
%	0	0	0	5	11	20	35	45	61	82	97	100

Will man den Verlauf der Nahrungsaufnahme in Abhängigkeit von der Saugzeit verfolgen, so wird auf Grund obiger Ergebnisse deutlich, dass keinesfalls Gruppen von Tieren zugleich gemessen werden dürfen. Vielmehr müssen durch die Messung einzelner Tiere zunächst alle diejenigen Individuen ausgeschieden werden, die das Phloem in der entsprechenden Zeit gar nicht erreicht haben. Von den verbleibenden Tieren hat aber wiederum nur ein bestimmter Teil in der Mindestzeit das Phloem erreicht, der grössere Teil erst im weiteren Verlauf der Versuchsdauer. Daher wurden zum Beispiel bei dreistündiger Saugzeit von 30 Läusen, die das Phloem erreicht hatten, nur 5 mit den höchsten Aktivitäten zur Errechnung der aufgenommenen Nahrung herangezogen. Auf diese Weise werden mit grösster Wahrscheinlichkeit nur diejenigen Tiere erfasst, die tatsächlich während der ganzen Versuchszeit im Phloem gesaugt hatten. Es ergab sich im Zeitraum von 1 bis 48 h die in der Figur dargestellte Beziehung. Die Aufnahme des Tracers in den Körper der Läuse nimmt bis zu etwa 12 h Saugzeit nahezu linear zu, wird nach 16 h merklich langsamer und strebt nach 24 bis 30 h allmählich einer Sättigung zu. Beachtlich ist, dass bereits nach 8 h die Hälfte der nach 48 h Saugzeit messbaren Aktivität erreicht ist.

Das mit dem Honigtau und den Junglarven abgegebene P^{32} konnte hier nicht berücksichtigt werden. Einbau und Exkretion von P^{32} bei *Megoura viciae* war bereits Gegenstand einer früheren Publikation[7]. Die in der Figur abgebildete Kurve lässt also genau genommen keinen Schluss auf die absolute Menge der aus der Pflanze aufgenommenen Nahrung zu. Die Kurve gibt vielmehr für die entsprechende Saugzeit an, wieviel P^{32} sich im Organismus befindet, teils noch im Darmlumen befindlich, teils bereits resorbiert und in der Hämolymphe befindlich oder schon in das Gewebe eingebaut.

Eine ausführlichere Darstellung der Ergebnisse wird an anderer Stelle erfolgen[11].

Summary. Problems connected with the food uptake of the aphid *Megoura viciae* Buckt., sucking in the phloem of *Vicia faba*, are studied by means of radioactive phosphate.

Outside the phloem there is no intake of food by the stylets of the aphid. They are able to reach the phloem earliest 7 min after the beginning of the puncture. But only 3 h later all aphids have reached the phloem. The variability in time taken to reach the phloem is very high. The aphids seem not to be able to aim at the phloem; presumable this process is more or less incidentally. In plants, which do not belong to the host plants of *Megoura viciae*, the aphid also pierces the phloem. Perhaps the aphids first in the phloem find out their host plant. The course of the ingestion of food is studied in relation to the time of sucking and shown in a diagram.

P. EHRHARDT

Institut für angewandte Zoologie der Universität Würzburg (Deutschland), 16. Mai 1961.

[10] K. ESAU, R. NAMBA und E. A. RASA, Hilgardia *30*, 517 (1961).

[11] Die Untersuchungen wurden mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft durchgeführt.

dentifizierung von β-Sitosterin als Hauptsterin es Kartoffelkäfers (*Leptinotarsa decemlineata* Say)

Unsere bisherigen Arbeiten über Wirt-Parasit-Beziehungen beim Kartoffelkäfer beschäftigten sich vor allem mit den in *Solanum*- und *Lycopersicon*-Arten vorkommenden Steroidalkaloidglykosiden[1]. Nunmehr wurden auch die in diesen Pflanzen sowie in verschiedenen Entwicklungsstadien des Insekts auftretenden Sterine in die Untersuchungen einbezogen. Dies erschien uns wichtig, da Insekten nach bisher vorliegenden Literaturbefunden[2] im allgemeinen weder zu einer Synthese lebensnotwendiger Sterine noch offensichtlich zu grösseren Umwandlungen aufgenommener Steroide befähigt sind, also ihren jeweiligen Bedarf an essentiellen Sterinen aus der Nahrung decken müssen. Ein völliger Mangel an Sterinen führt zum Tod des Insekts, und nicht ausreichende Versorgung hat Wachstums- und Entwicklungsstörungen sowie Beeinträchtigung der Metamorphose und Vermehrungsrate zur Folge. Einige Insekten sind auf bestimmte Sterine angewiesen, beispielsweise *Dermestes vulpinus* Fabr.[3] und *Attagenus piceus* Oliv.[4] auf Cholesterin oder 7-Dehydrocholesterin. Die bisher untersuchten phytophagen Insekten können nicht nur Phytosterine, sondern auch Cholesterin, 7-Dehydro-cholesterin und sogar 5α-Cholestan-3β-ol verwerten[5]. Durchweg wird die Ansicht vertreten, dass alle Insekten, und zwar auch die phytophagen, als Zoosterin Cholesterin (und 7-Dehydro-cholesterin) enthalten, was durch die Isolierung von Cholesterin aus Maikäfern (*Melolontha melolontha* L.) und Seidenraupen (*Bombyx mori* L.) sowie durch den Nachweis dieses Sterins in zahlreichen weiteren Insekten auch bewiesen schien[6–8]. Daneben soll in *Bombyx mori*[7] sowie in *Musca vicina* Macq.[8] resorbiertes und offensichtlich noch nicht umgewandeltes β-Sitosterin vorkommen. Kürzlich stellten Barbier, Reichstein, Schindler und Lederer[9] fest, dass Bienen (*Apis mellifica* L.) als Zoosterin 24-Methylencholesterin enthalten, eine Verbindung, die auch in der Nahrung der Bienen, im pflanzlichen Pollen, als Phytosterin vorkommt.

Im folgenden soll über die von uns aus Imagines und Puppen des Kartoffelkäfers sowie vergleichend hierzu aus Blättern der Kartoffelpflanze (*Solanum tuberosum* «Aquila») isolierten Sterine kurz berichtet werden.

Aus 22300 mit Kartoffelblättern gefütterten Käfern[10] (1237 g Trockengewicht) wurde durch erschöpfende Extraktion mit Petroläther, Verseifung des Rohfettes (335 g) und Behandlung des unverseifbaren Anteils (18 g) mit Digitonin eine Rohsterin-Fraktion (1,2 g) gewonnen. Dünnschichtchromatographisch (Silicagel «Riedel de Haen», Benzin (Sdp. 80–90°)/Essigester/Benzol (85:10:5, v/v), Sichtbarmachung mit Antimon(III)-chlorid/Eisessig) liessen sich 3 Substanzen (A–C) mit den Rf-Werten A = 0,81, B = 0,70 und C = 0,48 nachweisen (Cholesterin: Rf = 0,48). Durch Säulenchromatographie an Silicagel oder Florisil mit Benzin (Sdp. 80–90°)/Essigester/Benzol (90:5:5, v/v) liess sich das Gemisch im präparativen Maßstabe auftrennen, wobei nach Entfernung geringer Mengen nicht steroider Begleitstoffe für die Substanzen A–C die in Tabelle I angeführte Verteilung ermittelt wurde.

Ebenso wurden aus 7500 Puppen (140 g Trockengewicht, 21 g Rohfett, 2,6 g Unverseifbares, 0,25 g Rohsterin) sowie aus 7100 g Kartoffelblättern (Trockengewicht, 162 g Rohfett, 33 g Unverseifbares, 4,5 g Rohsterin[11]) die gleichfalls in Tabelle I genannten Fraktionen isoliert, die dünnschichtchromatographisch mit den aus Käfern gewonnenen Substanzen A–C übereinstimmen.

Substanz C, und zwar sowohl aus Käfern und Puppen als auch aus Kartoffelblättern, ist mit *β-Sitosterin* identisch. Dies ergab sich auf Grund der Elementaranalysen, der Infrarotspektren[12], der Schmelz- und Mischschmelzpunkte sowie der spezifischen Drehungen des Sterins und seiner Derivate (Tabelle II) und wurde durch Vergleich mit authentischem β-Sitosterin[13] (Mischsmp., IR-Spektrum) bestätigt. Weiterhin besitzt die bei katalytischer Hydrierung des Acetats (PtO_2/Eisessig) entstehende Verbindung die für Stigmastanol-acetat in der Literatur angeführten Konstanten (Tabelle II). Das aus Kartoffelblättern isolierte β-Sitosterin, jedoch nicht das aus Käfern und Puppen, dürfte nach dem IR-Spektrum (zusätzliche schwache Bande bei 970 cm^{-1}[14]), dem Wasserstoffverbrauch bei der Mikrohydrierung sowie nach der titrimetrisch bestimmten Brom-Aufnahme[15] geringe Mengen Stigmasterin enthalten. Auch Kartoffelknollen enthalten als Hauptsterin β-Sitosterin, daneben wenig Stigmasterin[16].

Tab. I. Verteilung der Substanzen A–C in den Sterin-Fraktionen von Imagines und Puppen des Kartoffelkäfers sowie von Kartoffelblättern

Substanz	Imagines	Puppen	Kartoffelblätter
A	1,5%	Spuren	60,4%
B	1,4%	Spuren	6,8%
C	97,1%	~ 100%	32,8%

[1] K. Schreiber, Züchter *27*, 289 (1957); Ent. exp. appl. *1*, 28 (1958). – H. Buhr, R. Toball und K. Schreiber, Ent. exp. appl. *1*, 209 (1958).

[2] H. Lipke und G. Fraenkel, Ann. Rev. Entomol. *1*, 17 (1956). – A. J. Clark und K. Bloch, J. biol. Chem. *234*, 2578, 2583, 2589 (1959). – R. E. Monroe, Nature (Lond.) *184*, 1513 (1959); sowie [3–8] u.a.

[3] G. Fraenkel, J. A. Reid und M. Blewett, Biochem. J. *35*, 712 (1941).

[4] H. McKennis, J. biol. Chem. *167*, 645 (1947).

[5] G. Fraenkel und M. Blewett, Biochem. J. *37*, 692 (1943). – Z. H. Levinson und E. D. Bergmann, Biochem. J. *65*, 254 (1957).

[6] H. Lettré in H. Lettré, H. Inhoffen und R. Tschesche, *Über Sterine, Gallensäuren und verwandte Naturstoffe*, 2. Aufl. (Stuttgart 1954), vol. 1, p. 132. – S. D. Beck und G. G. Kapadia, Science (Wash.) *126*, 258 (1957).

[7] W. Bergmann, J. biol. Chem. *107*, 527 (1934).

[8] E. D. Bergmann und Z. H. Levinson, Nature (Lond.) *182*, 723 (1958).

[9] M. Barbier, T. Reichstein, O. Schindler und E. Lederer, Nature (Lond.) *184*, 732 (1959). – M. Barbier und O. Schindler, Helv. chim. Acta *42*, 1998 (1959). – M. Barbier, M.-F. Hügel und E. Lederer, Bull. Soc. Chim. biol. *42*, 91 (1960).

[10] 24 h vor Abtötung wurde die Nahrungszufuhr eingestellt.

[11] Dieses Rohsterin enthielt noch beträchtliche Mengen (etwa 30%) eines chromatographisch leicht abtrennbaren Kohlenwasserstoffs vom Smp. 65,5° (aus Äthanol), vermutlich Triakontan (E. Gildemeister und F. Hoffmann, *Die ätherischen Öle*, 4. Aufl. (Berlin 1960), vol. III a, p. 3.

[12] Herrn Dr. K. Heller, Wissenschaftliche Laboratorien des VEB Jenapharm, Jena, danken wir für Aufnahme und Diskussion der IR-Spektren.

[13] Herrn Dr. R. K. Callow, London, sind wir für die freundliche Überlassung von authentischem β-Sitosterin (Smp. 138–140°) sehr verbunden.

[14] J. J. Johnson, M. F. Grostic und A. O. Jensen, Analyt. Chem. *29*, 468 (1957).

[15] M. Barbier und O. Schindler, Helv. chim. Acta *42*, 1998 (1959).

[16] J. J. Schwartz und M. E. Wall, J. Amer. chem. Soc. *77*, 5442 (1955).

Tab. II. Vergleich der physikalischen Konstanten von Substanz C aus Imagines und Puppen des Kartoffelkäfers sowie aus Kartoffelblätte mit β-Sitosterin

		Substanz C aus Imagines	aus Puppen	aus Kartoffelblättern	β-Sitosterin Literatur	
	Smp.	140–141°	140–141°	136–137°	137°[21]	140°[22]
	$[\alpha]_D$ (Chloroform)	– 36,6°	– 39,0°	– 38,7°	– 37°[21]	– 37,1 ± 2
Acetat	Smp.	129°	128–128,5°	128,5–129°	126–127°[21]	129,5°[22]
	$[\alpha]_D$ (Chloroform)	– 42,6°	– 43,2°	– 40,5°	– 42°[21]	– 42 ± 3°[22]
Benzoat	Smp.	143–146°	–	147°	146–147°[21]	147°[22]
	$[\alpha]_D$ (Chloroform)	– 13,8°	–	– 13,2°	– 14°[21]	
Hydrierprodukt	Smp.	134°	–	133–134°	138°[21]	134°[22]
(Acetat)	$[\alpha]_D$ (Chloroform)	+ 12,3°	–	+ 15,4°	+ 14°[21]	+ 15,5 ± 2°

Substanz A[17] kristallisiert aus 70prozentigem Isopropanol in farblosen Nadeln vom Smp. 108–109° und $[\alpha]_D$ + 46,9° in Chloroform (Acetat: Smp. 122–123°, $[\alpha]_D$ + 56,0° in Chloroform), zeigt keine Liebermann-Burchard-Reaktion und dürfte vermutlich in die Gruppe der Triterpene gehören. Weitere Substanz A konnte in dem nicht mit Digitonin fällbaren Anteil des Unverseifbaren (aus Kartoffelblättern) dünnschichtchromatographisch nachgewiesen werden.

Die in nur geringen Mengen isolierte *Substanz B* hat einen Smp. von 130° (aus Kartoffelblättern) bzw. von 152° (aus Kartoffelkäfern) und gibt eine stark positive Liebermann-Burchard-Reaktion. Ob es sich hier um ein 4-Methylsterin vom Typ des Lophenol (4α-Methyl-5α-cholest-7-en-3β-ol)[18] oder des Citrostadienol (4α-Methylstigmasta-7,24(28)-dien-3β-ol)[19] handelt, soll durch weitere Untersuchungen geklärt werden (Lophenol[20] und Substanz B zeigen zum Beispiel im Dünnschichtchromatogramm gleiche Rf-Werte und Nachweisreaktionen).

Nach diesen Ergebnissen ist β-Sitosterin nicht nur das Hauptsterin der Kartoffelblätter, sondern auch das Hauptsterin der mit diesem Substrat ernährten Kartoffelkäfer. Somit dürfte bei diesem phytophagen Insekt keine Umwandlung des mit der Nahrung aufgenommenen Phytosterins in ein spezielles Zoosterin erfolgen. Hiermit wird der grundsätzliche Befund von BARBIER, REICHSTEIN, SCHINDLER und LEDERER[9], dass Körper- und Nahrungssterine eines nicht zoophagen Insekts identisch sein können, auch für den Kartoffelkäfer bestätigt. Hervorzuheben ist die bevorzugte Aufnahme bzw. Verwertung von β-Sitosterin, denn die in Kartoffelblättern zusätzlich vorhandenen Substanzen A und B sowie auch Stigmasterin konnten im Insekt nur in Spuren bzw. gar nicht nachgewiesen werden (vgl. Tabelle I).

Summary. β-Sitosterol is the principal sterol in th adults and pupae of the Colorado beetle (*Leptinotars decemlineata* Say) as well as in the leaves of the potat plant (*Solanum tuberosum* 'Aquila'). These results led us t suspect that this phytophagous insect utilizes the dietar phytosterol without conversion.

K. SCHREIBER, G. OSSKE und G. SEMBDNE

Deutsche Akademie der Landwirtschaftswissenschaften Berlin, Forschungsstelle Mühlhausen/Thüringen (Deutsch land), 24. Mai 1961.

[17] Die IR-Spektren der Substanzen A aus Käfern und Kartoffe blättern zeigen keine Unterschiede.

[18] C. DJERASSI, J. S. MILLS und R. VILLOTTI, J. Amer. chem. Soc. 1005 (1958). – C. DJERASSI, G. W. KRAKOWER, A. J. LEMIN, L. LIU, J. S. MILLS und R. VILLOTTI, J. Amer. chem. Soc. *80*, 62 (1958).

[19] A. WEIZMANN und Y. MAZUR, J. org. Chem. *23*, 832 (1958) Y. MAZUR, A. WEIZMANN und F. SONDHEIMER, J. Amer. che Soc. *80*, 1007, 6293 (1958).

[20] Wir danken Herrn Prof. W. KLYNE, London, bestens für d freundliche Überlassung von Lophenol sowie weiterer Vergleichs substanzen aus der «Steroid Reference Collection» des Medic Research Council.

[21] W. BERGMANN in R. T. HOLMAN, W. O. LUNDBERG und T. MALKIN *Progress in the Chemistry of Fats and other Lipids* (London 1952) vol. *1*, p. 18.

[22] D. R. IDLER, S. W. NICKSIC, D. R. JOHNSON, V. W. MELOCHE H. A. SCHUETTE und C. A. BAUMANN, J. Amer. chem. Soc. *75* 1712 (1953).

Operative Entfernung des Gehörorganes ohne Schädigung angrenzender Labyrinthteile bei Putenküken

Für Untersuchungen der ontogenetischen Entwicklung von Lautäusserungen sowie bei der Analyse des Zusammenwirkens von arteigenen Lauten mit Ausdrucksbewegungen ist es unter Umständen unerlässlich, das Gehörorgan auszuschalten[1–3]. Verschliessen des äusseren Gehörganges oder Entfernung der Gehörknöchelchen bewirkt nur einen Empfindlichkeitsverlust von etwa 40 db. Zerstört man das innere Ohr, so werden meist die angrenzenden Labyrinthteile in Mitleidenschaft gezogen, und das Versuchstier ist in seinem Gesamtverhalten so sehr verändert, dass es schwer wird, im einzelnen Ursache und Wirkung einander zuzuordnen. Überdies ist mit einer erheblichen Sterblichkeitsrate bei den operierten Tieren zu rechnen.

SCHWARTZKOPFF hat – in Anlehnung an frühere Veröffentlichungen von EWALD, TRENDELENBURG, TULLIO et al. – an Dompfaffen und anderen Singvögeln verschiedene Methoden der Exstirpation der Lagena und des Ductus cochlearis erprobt und weiterentwickelt[4]. Wir

[1] R. HÜCHTKER und J. SCHWARTZKOPFF, Exper. *14*, 106 (1958).

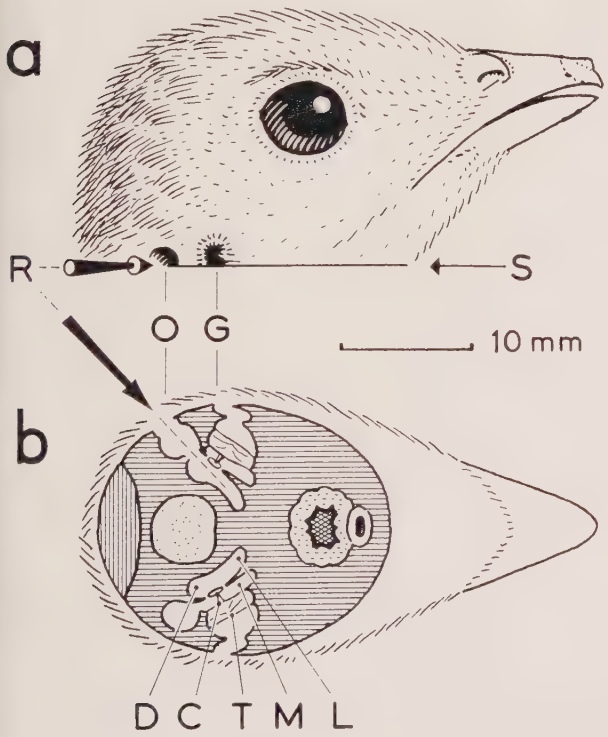
[2] E. MESSMER und I. MESSMER-BERGSTEIN, Z. Tierpsychol. *13*, 341 (1956).

[3] W. M. SCHLEIDT, M. SCHLEIDT und M. MAGG, Behaviour *16*, 254 (1960).

[4] J. SCHWARTZKOPFF, Z. vgl. Physiol. *31*, 527 (1949).

stellten fest, dass sich SCHWARTZKOPFFS Methode sehr gut bei Küken von *Meleagris gallopavo* anwenden lässt, und – nach einer gewissen Übung – kaum Nebenwirkungen auftreten. Von 28 erfolgreich ausgeführten Exstirpationen war nur in einem Fall eine nachhaltige Störung des Gleichgewichts zu beobachten, und *kein* Tier ist während der Operation oder an ihren Folgen gestorben. Schwierigkeiten ergaben sich nur bei der Dosierung des Narkotikums (0,03–0,04 ml Pernocton 10%/Tier) aus der geringen Differenz zwischen Wirk- und Letaldosis. Die Ursache liegt möglicherweise darin, dass bei den Eintagsküken der Dottersack einen erheblichen Teil des Körpergewichtes ausmacht, dessen Stoffwechselaktivität mit der des übrigen Gewebes jedoch kaum vergleichbar ist. Eintagsküken bieten jedoch zwei entscheidende Vorteile: die Schädelkapsel und die Cochlea sind an der Operationsstelle zu diesem Zeitpunkt noch knorpelig und erleichtern die Präparation sehr wesentlich – schon nach wenigen Tagen beginnt die Verknöcherung, und die reiche Blutversorgung macht den Eingriff fast unmöglich – und zweitens zehren die Tiere in diesem Alter noch vom Dottersack, ihr empfindlicher Stoffwechsel wird durch die Narkosedauer und den Operationsschock kaum gestört. Es hat sich bewährt, am ersten Lebenstag eine Seite und am zweiten die andere zu operieren. Dadurch wird die Operationsdauer auf ein erträgliches Mass begrenzt, und die Tiere haben in der Zwischenzeit Gelegenheit zu fressen und können leichter auf den Pfleger geprägt werden.

Operationsvorbereitung. Instrumentarium: Kopfhalter (Abbildung bei SCHWARTZKOPFF[4]), Präparierlupe oder Binokular (25–60fach) mit möglichst grossem Arbeits-Abstand und Beleuchtung in der Richtung der optischen Achse, kleine Lanzettnadel, feine Splitterpinzette, «Wurzelkanal-Haken», Papierspitzen, extra fein, saugend (beides in Dental-Depots vorrätig), UHU-Hart. Zweckmässig ist es auch, sich an fixiertem Material genau über die Lagebeziehungen zu informieren (Figur) und sich die Lage der Gefässe einzuprägen.



Orientierung der Operationsöffnung = O am Kükenkopf; R = Richtung des Operationskanales, G = äussere Gehörgangöffnung, S = Schnittebene von 1b, D = Ductus cochlearis, C = Columella, T = Trommelfell, M = Mittelohr, L = Lagena.

Operationsgang. Man rupft am hinteren unteren Rand der Gehörgangöffnung eine etwa 1 cm² grosse Fläche, schneidet die Haut auf (unter Schonung der Hautvenen) und löst die Muskulatur in Richtung zur Schädelbasis von der Kapsel (die aufsteigende Arterie kann abgebunden werden, auf die Zungenbeinhörner im unteren Teil des Operationsfeldes muss geachtet werden – Lage variiert erheblich!). Es wird eine Knorpelplatte sichtbar, an deren hinterem Rand der Sinus venosus der Bogengang-Kreuzung durchschimmert, oben wird sie vom Canalis semicircularis externus begrenzt (dem eine – noch unsichtbare – Vene anliegt), nach vorne reicht sie bis etwa 1 mm an den äusseren Gehörgang und unten ist schon Knochen sichtbar. Bricht man mit der Lanzettnadel – unter sorgfältiger Schonung der umliegenden Gefässe und des Knochens – die Knorpelplatte heraus, so kann man in der Tiefe die Columellafussplatte liegen sehen. Blutungen - besonders am Sinus venosus – sind sehr zeitraubend, stehen aber nach einigen Minuten, und das Operationsfeld kann – auch in der Tiefe – mit den Papierspitzen wieder vorsichtig gereinigt werden. Nun entfernt man mit dem Haken die caudal vom Foramen ovale liegenden Knorpelspangen und bricht eine Öffnung in den Recessus scalae tympani. Die austretende Perilymphe (bzw. nachströmender Liquor cerebrospinalis) wird abgetupft, und es gelingt meist nach wenigen Versuchen, den Knorpelrahmen des Ductus cochlearis mit der Pinzette zu fassen und samt der anhängenden Lagena herauszuziehen. Da die Operationsöffnung genau in der Achse des Ductus cochlearis liegt (Figur b), kann man den Knorpelrahmen auch ohne Mühe mit dem Wurzelkanalhaken herausziehen. Nach der Exstirpation werden Muskel und Haut in ihre Ausgangslage zurückgebracht. Man verschliesst die Operationsöffnung durch Verkleben der oberhalb und unterhalb verbliebenen Dunen mit UHU-Hart. – Die Dauer der Operation hängt im wesentlichen vom Zeitverlust durch Blutungen ab. In einem Fall benötigten wir für den Eingriff $2^1/_2$ Stunden (das Tier war schon kurze Zeit später voll aktiv und konnte allein fressen), im allgemeinen benötigt man jedoch weniger als eine Stunde. Der Erfolg der Operation ist völlig sicher (Prüfung bei erwachsenen operierten Hähnen durch Schwellenbestimmung der Kollerreaktion[5]) – vorausgesetzt, dass man den D. cochlearis und die Lagena wirklich entfernt hat. Die Form des Gehörorganes ist aber so charakteristisch, dass eine Verwechslung ausgeschlossen ist.

Summary. A method of deafening freshly hatched turkeys is described. In 28 cases the Ductus cochlearis including the Lagena was removed without any noticeable damage to equilibrium functions. All birds were raised and behaved normally in all other except auditory functions, only one poult showed a certain deviation in pecking at small grains.

W. M. SCHLEIDT

Max-Planck-Institut für Verhaltensphysiologie, Seewiesen (Obb., Deutschland), 15. Juni 1961.

[5] W. M. SCHLEIDT und M. SCHLEIDT, Naturwissenschaften *45*, 119 (1958).

Two Cases of Acatalasia in Switzerland

Acatalasia, an inherited defect in the enzyme pattern of red cells and other tissues, has been detected by TAKAHARA and MIYAMOTO in 1947[1]. So far 53 cases of this abnormity—all of them Japanese subjects—have been reported[2]. Since no case has been found yet in Western countries, it might be of interest that recently two cases have been observed in Switzerland. This was noticed in a screening test for acatalasia covering all blood samples examined 1961 in the Army Blood Group Laboratory of the Swiss Red Cross Blood Transfusion Service. It merely consists of mixing a drop of a 3–5% red cell suspension in saline with 1 drop of 1% phosphate-buffered H_2O_2-solution (pH 7.2). Up to June 29th, 18459 blood samples have been examined. The only persons among these male of 19 years having shown this anomaly so far, are F. V. from Riddes (Canton Valais) and A. B. from Flerden (Canton Graubünden).

The hemolysate of centrifuged red cells of these subjects behaves as indicated in the Table. It can be seen from it that its Catalase activity as determined by FEINSTEIN's Perborate-method[3] is about $^1/_2$% as compared with that of red cells from a normal subject. As a base of comparison, the ratio Catalase/Hemoglobin (determined as Cyan-Methemoglobin) has been chosen.

According to the record of the medical examination, both subjects are in a good state of health. A thorough investigation of the red cell and serum-enzyme pattern of these subjects, as well as other members of these families is under way.

Catalase-activity and hemoglobin-content in dilute hemolysates of red cells from normal humans and two cases of acatalasia

No.	Catalase-activity expressed as m Eq H_2O_2 decomposed per ml of hemolysate	mg Hemoglobin per ml of hemolysate	$Q \frac{\text{m Eq } H_2O_2 \text{ decomp.}}{\text{mg hemoglobin}}$
1 F.V. (Acatalasia)	0.25	38.0	0.66×10^{-2}
2[a] (normal)	65.0	28.8	2.26
3 A.B. (Acatalasia)	0.30	20.2	1.48×10^{-2}
4[a] (normal)	33.2	15.9	2.10

[a] Normal subjects of the same sex, age and region, whose blood has been handled in the same way.

Zusammenfassung. Es wird über 2 Fälle von Akatalasie, einem seltenen, bisher ausschliesslich bei Japanern beobachteten Enzym-Defekt, berichtet[4].

H. AEBI, J. P. HEINIGER, R. BÜTLER, and A. HÄSSIG

Medizinisch-chemisches Institut der Universität Bern und Zentrallaboratorium des Blutspendedienstes des Schweizerischen Roten Kreuzes, Bern (Switzerland), July 10, 1961.

[1] S. TAKAHARA and H. MIYAMOTO, J. otorhinolaryngological Soc. Japan *51*, 163 (1948).
[2] Personal communication from Dr. KOZOO KAZIRO (Sept. 1960).
[3] R. N. FEINSTEIN, J. biol. Chem. *180*, 1197 (1949).
[4] *Note added in proof* (September 11): Within the family of these persons 4 more cases of acatalasía and a number of hypocatalasic carriers have been detected.

Cholinesterase Activity within the Renal Tissue of *Helostoma temmincki*

As no literature data are available on this subject, we studied the cholinesterase activity within the renal tissue of the Teleost *Helostoma temmincki* Cuvier (Anabantidae), using the technique of COUPLAND and HOLMES[1] and the nomenclature of AUGUSTINSSON and NACHMANSOHN[2]. For this purpose the fishes were killed by decapitation, after which the kidneys were excised and frozen sections cut at 50 μ and stained for true cholinesterase[1]. According to the prescription of GILBERT[3], also paraffin sections were obtained by cutting 1 mm slices from the kidneys and laying them in the substrate at 37°C for 18 h, the subsequent treatment being according to COUPLAND and HOLMES[1]. After this, the tissue was embedded in paraffin and sectioned in the normal way. As in the domestic fowl[3], with this method the very heavy deposit on the surface of the block tended to obscure a certain amount of detail, but with thin sections the same results were obtained as with the frozen sections. The pseudocholinesterase was also demonstrated in both methods by substituting butyrothiocholine iodide as substrate. According to the method of GEREBETZOFF[4], the controls were obtained by a preliminary incubation of the sections in 1×10^{-7} di-*iso*-propylfluorophosphonate.

As in the kidney of domestic fowl[3], the distribution of both true and pseudocholinesterase was very similar, but the degree of staining for the two enzymes appeared to differ considerably. Both enzymes were observed in quantity in the vascular system, although this could be expected, since it has been demonstrated that cholinesterase, either pseudocholinesterase or a mixture of true and pseudocholinesterase, is not only present in avian[5], but also in fish plasma. A positive cholinesterase activity was observed in Bowman's capsule, particularly for true cholinesterase, which finding may no doubt be related to the possible presence of these enzymes in fish plasma. The tubule walls were free, but the ureter wall stained heavily for both enzymes. In the contents of the lumen of tubules or ureter, no cholinesterases were demonstrated, however, which suggested that these enzymes are not being excreted except in quantities very much lower than present in the plasma or in a changed form. Between kidneys obtained from male and female fishes, no difference could be observed.

VAN DER KLOOT[6] suggested that the cholinesterase is involved in the sodium pump mechanism, and consequently the presence of these enzymes in Bowman's capsule is possibly related to the renal function. GILBERT[3] correctly observed that this suggestion must remain speculative until more is known about the physiological significance of these enzymes. As the cholinesterase

[1] R. E. COUPLAND and R. L. HOLMES, Quart. J. micro. Sci. *98*, 327 (1957).
[2] K. B. AUGUSTINSSON and D. NACHMANSOHN, Science *110*, 98 (1949).
[3] A. B. GILBERT, Nature *189*, 1009 (1961).
[4] M. A. GEREBETZOFF, *Cholinesterases* (Pergamon Press, London 1959).
[5] K. B. AUGUSTINSSON, Acta phys. scand. *15*, Suppl. 52 (1948).
[6] W. G. VAN DER KLOOT, J. gen. Physiol. *41*, 879 (1958).

activity within the renal tissue of *Helostoma* in general shows good agreement with the distribution of this enzyme within the kidney of the domestic fowl[3], this process must no doubt be considered of more general importance.

Zusammenfassung. Eine positive Cholinesterase-Aktivität in der Niere von *Helostoma temmincki* wurde in den Bowmanschen Kapseln gefunden. Die Tubuli waren frei, aber der Ureter zeigte eine positive Reaktion sowohl für Cholinesterase wie auch für Pseudocholinesterase.

A. Stolk

Department of Histology, Free University, Amsterdam (Netherlands), June 20, 1961.

The Effect of Early Weaning on Spermiogenesis in Adult Rats

Infant rats can be weaned from the mother animal and can live independently when aged 15–18 days postnatally, while normally they are weaned on about the 30th postnatal day[1]. It was shown in previous papers that early (premature) weaning shortens the lifespan of female rats[2], decreases fertility[2] and their ability to learn (elaborate conditioned reflexes) when aged 8 months is weakened[3], although their final body weight and appearance are unaffected.

In order to throw further light on the impaired fertility of prematurely weaned rats, the testicles of rats of the Wistar B-Konárovice strain were examined in animals weaned normally (day 30) and prematurely (day 18). They were raised on a standard diet[4], did not come into contact with female animals, and were killed by decapitation when aged 6 or 12 months.

It was found that in 6 months old rats the testicles of both groups were normal (Figure 1 and 2). In animals aged 12 months, however, severe degenerative changes are found in the prematurely weaned group, the spermiogenic epithelium being impaired or even absent and substituted by Sertoli cells. Figure 1 shows that the width of the spermiogenic tubules is also smaller. No impairment of spermiogenesis was found in normally weaned animals.

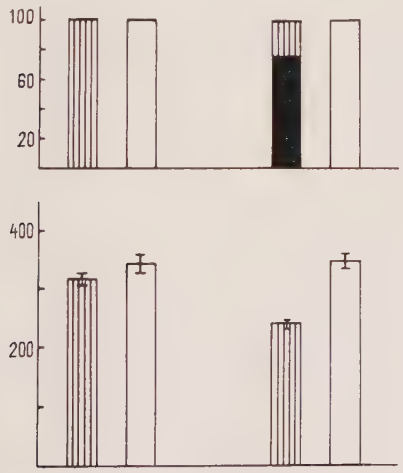
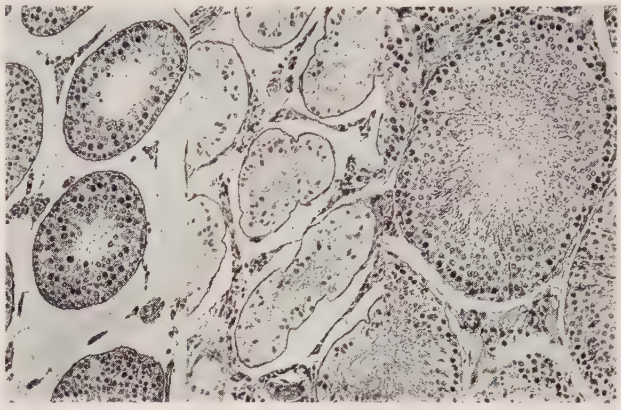


Fig. 1. *Upper half:* Frequency of occurrence of degenerative changes in testicles. First two columns: rats aged 6 months. Second two columns: rats aged 12 months. Shaded: prematurely weaned rats. White columns: normally weaned rats. Black part of columns: % of animals with impaired spermiogenesis. Statistical significance in rats aged 1 year: $p = 0.0015$ (calculated according to Fisher[5]. Ordinate: %, abscissa: as described. *Lower half:* Average width of spermiogenic tubules in relative figures. Columns as in upper part. Vertical lines indicate SE. Ordinate: relative scale of micrometer. Statistical significance for rats aged 12 months: $p < 0.005$ (t-test).



a b c

Fig. 2. (a) (b) Pathological changes in prematurely weaned rats. (a) severe inhibition of spermiogenesis, which only goes up to spermatocytes and spermatides; pyknosis and karyorrhexis of spermatocytes. Oedema in the interstitium. (b) Disappearance of spermiogenic epithelium and its substitition by hyperplastic Sertoli cells. (c) Testicles of normally weaned rats. Normal spermiogenesis. HE, × 105.

Our experiments thus show that premature weaning causes impairment of spermiogenesis in adult animals which cannot be demonstrated earlier in life (at 6 months). How far this is related to impairment of fertility in prematurely weaned female rats, which had prematurely weaned males as partners, will have to be elucidated.

Zusammenfassung. Junge, vorzeitig (18 Tage nach der Geburt entwöhnte Ratten) zeigen im Alter von 12 Monaten Schädigungen im spermiogenen Hodenepithel. 12 Tage später entwöhnte Ratten entwickeln sich normal. Die beobachteten Schädigungen treten im Alter von 6 Monaten noch nicht auf.

K. Kubát, V. Flandera, P. Hahn, and O. Koldovský

II. Institute of Pathology, Medical Faculty, Charles University, and Institute of Physiology, Czechoslovak Academy of Sciences, Prague (Czechoslovakia), May 29, 1961.

[1] J. Křeček, H. Dlouhá, and J. Křečková, Physiol. Bohemoslov. *6*, 26 (1957).

[2] M. Kraus, J. Anděl, H. Dlouhá, V. Flandera, J. Křeček, J. Křečková, and J. Rokos, Paper presented at the 2nd ontogenetic Conference, Prague (1960).

[3] V. Nováková, J. Faltín, V. Flandera, P. Hahn, and O. Koldovský, Čs. fysiol. *10*, in press (1961).

[4] P. Fábry, Čs. fysiol. *8*, 529 (1959).

[5] R. A. Fisher, *Statistical Methods for Research Workers* (London 1948), p. 96.

Modification in the Fecundity and Life Span of the Moth *Corcyra cephalonica* Staint. Receiving Dietary Antibiotics in the Larval Stages

Limited studies have shown that an alteration in the biology of insects may occur following the administration of antibiotics. Saxena and Srivastava[1] have summarised the results of studies by various workers on the subject. Instances of alterations in biology indicate that the administration of antibiotics either produce beneficial effects on the biology of insects or remain ineffective and may even produce deleterious effects[2–4]. The present communication deals with the study of the effects of three antibiotics at different levels of application on the fecundity and longevity of the moth *Corcyra cephalonica* Staint., which is used as host for mass culture of insect parasites of agricultural importance. Nothing is known, so far, about the role of antibiotics in the biology of this insect.

Single pair culture of corcyra was used in this experiment. The culture was successfully raised on crushed 'juar' (*Sorghum vulgare*) in jars of 20 × 15 cm size at temperatures ranging from 29°C to 35°C. For experimental purposes 25 × 5 cm glass vials were filled with 120 g of crushed 'juar'. Weighed quantities of the antibiotics Penicillin, Oleandomycin and Terramycin were incorporated in the diet by thoroughly distributing the premix in the vials containing the food. Premix was prepared in glucose in convenient amounts for efficient mixing. The control groups received an equal amount of glucose only in the diet. Twenty five freshly laid eggs (24 h layings) were introduced in the experimental vials containing the different levels of the various antibiotics. Four replications were used for each treatment. The biological observations on fecundity and longevity in respect of each treatment were regularly recorded after the emergence of the moths. Single pairs were confined separately in glass vials 20 × 5 cm for fecundity and life span records. These vials contained thirty small pieces of black papers, rolled in balls of the size of 'juar' seed. No food was supplied to the moths. The observations are summarised in the Tables I and II. The data have been analysed statistically and the conclusions drawn are significant as a result of X^2 (Chi-Square) Test[5].

It is evident from Table I that Oleandomycin and Terramycin had no effect on the fecundity at 50 p.p.m. level while Penicillin gave a significant increase in the number of eggs laid per female. Terramycin proved ineffective at all levels of application. Penicillin showed an increasing fecundity response at the levels of 100 p.p.m. to 1000 p.p.m. Oleandomycin enhanced the fecundity at 100 p.p.m. and 500 p.p.m. levels, but significantly reduced it at the 1000 p.p.m. level. The data summarised in Table II reveal that the life span of male moths remained unaffected by the administration of any one of the antibiotics. Penicillin, Oleandomycin and Terramycin had no effect at 50 p.p.m. level on any sex. The longevity of females was also generally not affected by any of the antibiotic treatments excepting Oleandomycin at 1000 p.p.m. level where the life span was found to be considerably reduced.

Résumé. L'auteur à constaté que l'oléandomycine et la terramycine n'ont aucun effect sur la fécondité et la longévité de *Corcyra cephalonica* Staint à la dose de 50 parts per million. La terramycine reste inefficace quelqu'en soit le dosage. La pénicilline augmente graduellement la fécondité à des doses de 50 à 1000 p.p.m. Il en est de même de l'oléandomycine à 100 et 500 p.p.m., mais à 1000 p.p.m., la fécondité diminue et dans ce cas la longévité des individus de sexe féminin est aussi considérablement réduite.

Daya Bhanu

Department of Zoology, M. B. College, Udaipur (India), June 9, 1961.

Tab. I. Effect of various antibiotics on the fecundity of moths.

Doses parts per million	Penicillin No. observed	Penicillin Mean No. of eggs	Oleandomycin No. observed	Oleandomycin Mean No. of eggs	Terramycin No. observed	Terramycin Mean No. of eggs
50	30	119	40	107	27	97
100	32	127	23	137	34	103
500	35	143	33	132	21	100
1000	28	167	37	72	36	102
Control	39	103	29	110	38	99

[1] H. C. Saxena and B. K. Srivastava, Proc. Nat. Acad. Sci. *30B*, 15 (1961).
[2] E. A. Steinhaus and C. R. Bell, J. Econ. Ent. *46*, 582 (1953).
[3] M. R. V. Murthy, B. S. Shankaranarayana, and M. Sreenivasaya, J. Sci. Ind. Res. *13B*, 331 (1954).
[4] F. H. Harries, J. Econ. Ent. *54*, 122 (1961).
[5] F. Wilcoxon, Biometrics Bull. *1*, 80 (1945).
[6] Grateful thanks are due to Dr. B. K. Srivastava, Entomologist to the Government of Rajasthan, Jobner for guidance and to Principal V. V. John for providing necessary facilities and encouragement. Gift of the antibiotics through M/S Dumex Private Ltd. Bombay is thankfully acknowledged.

Tab. II. Effect of various antibiotics on the longevity of moths

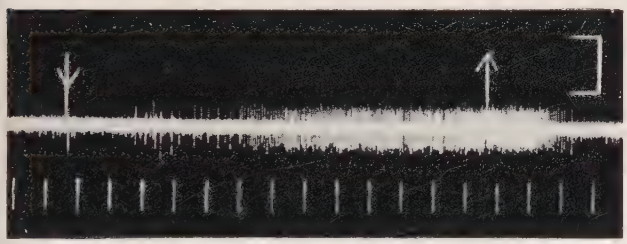
Doses (parts per million)	Males Penicillin No. observed	Males Penicillin Average longevity (days)	Males Oleandomycin No. observed	Males Oleandomycin Average longevity (days)	Males Terramycin No. observed	Males Terramycin Average longevity (days)	Females Penicillin No. observed	Females Penicillin Average longevity (days)	Females Oleandomycin No. observed	Females Oleandomycin Average longevity (days)	Females Terramycin No. observed	Females Terramycin Average longevity (days)
50	30	6	40	6	27	7	30	7	40	6	27	7
100	32	6	23	6	34	6	32	6	23	8	34	6
500	35	8	33	7	21	7	35	7	33	6	21	7
1000	28	7	37	7	36	6	28	6	37	3	36	6
Control	39	7	29	6	38	6	39	7	29	7	38	6

Sensitivity of Cortical Neurones to Acetylcholine

In spite of many claims for the existence of cholinergic transmission between neurones in the cerebral cortex[1,2], the direct stimulation of cortical cells by acetylcholine has never been demonstrated conclusively.

We have used compound micropipettes[3] to study the sensitivity of cortical neurones to several agents. The pipettes had 5 barrels: one, filled with 2.7 *M* NaCl, recorded the extracellular electrical activity of single units; the four others contained strong solutions of acetylcholine and other substances, which could be released in the immediate vicinity of the neurones by iontophoresis. The tips of the pipettes had a diameter of 5–10 μ and they were easily inserted into the cortex after removal of the pial layer.

We have now examined 1367 cells in various cortical areas in 13 cats anaesthetized with Dial or Chloralose. All cells were excited by *L*-glutamate; this action and any spontaneous activity were effectively blocked by γ-aminobutyric acid. Of the total, 200 cells were found to be sensitive to acetylcholine, judging by either a clear increase in the frequency of spontaneous activity, or the firing of quiescent cells. To obtain an effect, a current of 0.05–0.1 μA was passed through the acetylcholine barrel for a minimum of between 2 and 20 sec. When the acetylcholine current ceased, the heightened activity persisted for periods which varied between 5 and 60 sec. By passing a similar (or even much stronger) outward current through another barrel containing e.g. Na glutamate, it was easy to show that the observed excitation cannot be ascribed to the electrotonic effects of the flow of current.



Acetylcholine sensitive unit 1.2 mm deep in anterior part of lateral gyrus. Acetylcholine application (outward current of 0.1 μA) begun at 1st arrow and ended at 2nd arrow. Time pips are at 1 sec intervals and voltage calibration shows 0.2 mV.

Acetylcholine sensitive neurones were also excited, though to a lesser extent, by carbamylcholine, propionylcholine and succinylcholine, but not butyrylcholine. They were affected by neostigmine and edrophonium applied in a similar manner; both potentiated the action of acetylcholine, or even excited the cells. On the other hand, tubocurarine could not be shown to have any blocking action. The only effect observed in some cases was a delayed but very pronounced excitation. Nicotine had a similar exciting action, which bore no relation to the acetylcholine sensitivity. Atropine and hyoscine had a non-specific depressant effect on nearly all the cortical neurones to which they were applied (spinal cord neurones[4]). So far, only with gallamine have we been able to produce a selective block of acetylcholine.

Acetylcholine sensitive neurones tended to occur in clusters, and they very often showed spontaneous activity related to slow waves of the electrocorticogram. Although we have found a few sensitive neurones in most areas, they were distributed mainly in the primary somatosensory, visual and auditory receiving areas; the greatest concentrations were seen in the primary visual area of some of the cats.

Resumé. Sur 1367 neurones de l'écorce cérébrale du chat, examinés directement par la méthode iontophorétique, il a été possible d'en stimuler 200 par l'acétylcholine. Tous les neurones sont fortement excités par le *L*-glutamate et inhibés par l'acide γ-aminobutyrique.

K. Krnjević and J. W. Phillis

ARC Institute of Animal Physiology, Babraham (Cambridge, England), June 21, 1961.

[1] W. Feldberg, Physiol. Rev. *25*, 596 (1945).
[2] W. Feldberg, in *Metabolism of the Nervous System* (Ed. Richter, Pergamon Press, London 1957), p. 493.
[3] D. R. Curtis and R. M. Eccles, J. Physiol. *141*, 435 (1958).
[4] D. R. Curtis and J. W. Phillis, J. Physiol. *153*, 17 (1960).

New Central Stimulants

In the course of an investigation of the synthesis of new central stimulants, a series of 2-piperidyl-(1)- and morpholinyl(4)-3-substituted phenylpropionic acid esters and the corresponding propanols were synthesized. The compounds synthesized in this connection include: methyl 2-piperidyl(1)-3-phenylpropionate (CN1), 2-piperidyl(1)-3-phenylpropanol (CN2), methyl 2-morpholinyl(4)-3-phenylpropionate (CN3), 2-morpholinyl(4)-3-phenylpropanol (CN4), methyl 2-piperidyl(1)-3-(*p*-methoxyphenyl)-propionate (CN5), 2-piperidyl(1)-3-(*p*-methoxyphenyl)-propanol (CN6).

During a screening study with mice for central stimulant activity (spontaneous activity), these compounds showed the following order of decreasing potency: CN2, CN6, CN4, CN5, CN3, CN1. As CN2 was found to be most active, it was studied further for its central stimulant activity in different species of animals with the following results:

(1) 50–60 mg/kg injected intraperitoneally (i.p.) in mice produced marked increase in spontaneous activity. At 70, 80, and 100 mg/kg, the animals became extremely active. Normally docile animals could not be controlled in 12″ high cages unless a lid was put on. Clonic flexor convulsions occurred at all these dose levels. CD 50 was between 70–80 mg/kg and LD 50 around 150 mg/kg.

(2) In rats 30–40 mg/kg given i.p. caused increase in spontaneous activity within 5 min. After 100 mg/kg the response of the animals to any disturbance by auditory or visual stimuli was exaggerated. The effects seemed to disappear in 60–90 min with no signs of depression. However, at higher doses such as 150 mg/kg the animals developed flexor clonic convulsions and the surviving animals showed decreased spontaneous activity.

(3) 30–40 mg/kg given i.p. to dogs produced increased alertness and acute awareness of slightest disturbance in the surroundings. At 50 mg/kg this effect was followed by a furious struggle to get released and loss of interest in the

surroundings. In 12 min flexor clonic convulsion appeared. The effect began to decrease in 25–30 min and excitement was over in 25–30 min.

(4) In anaesthetised cats and dogs differential action towards pressor amines was noticed. The pressor effect of 5 µg adrenaline and nor-adrenaline was increased, while the effect of 2–4 mg of amphetamine and ephedrine was reduced or blocked by 20 mg/kg intravenously in dogs and 30 mg/kg in cats.

Detailed studies of compounds in these series will be communicated in due course.

Zusammenfassung. Mit 2-Piperidyl(1)-3-phenylpropanol (CN_2) wird an Mäusen, Ratten und Hunden eine deutliche zentralstimulierende Wirkung festgestellt. An anästhesierten Katzen und Hunden blockiert CN_2 die vasopressive Wirkung des Amphetamins und Ephedrins und verstärkt diejenige der Catecholamine.

R. S. KAPIL, NITYA ANAND, M. M. VOHRA, and J. D. KOHLI

Central Drug Research Institute, Lucknow (India), March 30, 1961.

The Infundibular Recess in the Brain of *Camelus dromedarius* with Particular Reference to its Neurosecretory Pathways into the Third Ventricle

It is thought that the neurosecretion plays a part in the control of the organism's fluid balance. Since ancient times, the camel is particularly renowned for its singular water economy. It is able to drink only once a week; on the other hand, it is able to drink water of such high salinity that man, for instance, would be poisoned by it[1].

The present work was undertaken in order to see if the peculiar water economy of the camel might be based on some morphological peculiarity in its hypothalamo-hypophysial system. Conditions distinct from those in other animals were found specially in the infundibular recess.

The material consisted of three brains, which were fixed in 10% formalin, embedded in paraffin, and sections were made sagittally at 5–7-micra. Staining was done with haematoxylin-eosin, Heidenhain's iron-haematoxylin, Gomori's chrome-haematoxylin and aldehyde-fuchsin.

The ventral part of the third ventricle formed a distinct infundibular recess. The posterior part of the recess was joined to a long, narrow bay running caudally, produced as a result of the forward pressure exerted on the caudal wall of the infundibulum by the pars tuberalis of the hypophysis.

The ependyma of the floor of the recess, and in the said bay, consisted of flat cells. The ependymal cell layer adjoined to a subependymal tissue with abundant quantities of hyaline mass visible in the haematoxylin-stained preparations, occurring in places in large drops. The mutual connection between the ependymal cells was broken in numerous places, where hyaline material was then seen also in the cell interstices. This made the margin of the ventricle hard to define. In certain places, hyaline material occurred also on the surface of the ependyma in the lumen of the ventricle. The hyaline material was particularly abundant around the subependymal vessels. Such

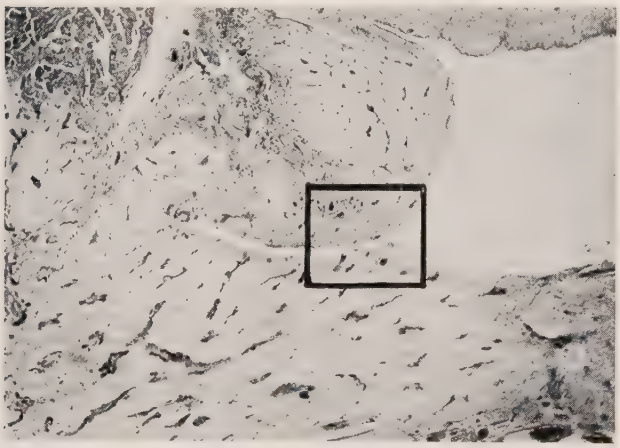


Fig. 1. Part of the floor of the infundibular recess and the bay extending caudally from it. – Haematoxylin-eosin; ×16.

[1] Editorial, Modern Medicine *28*, 14 (1960).

Fig. 2. The area of the rectangle in Figure 1. Neurosecretory material in great profusion in the ependymal barrier, subependymally and around the subependymal vessels. – Aldehyde-fuchsin; ×100.

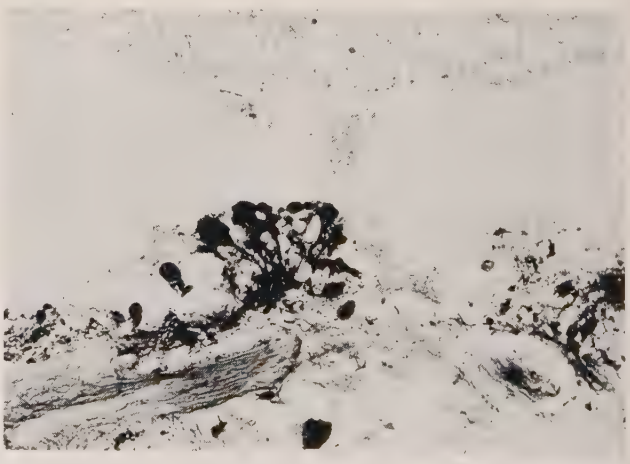


Fig. 3. Neurosecretory material around a subependymal vessel and extending as protuberances into the third ventricle. – Aldehyde-fuchsin; ×200.

vessels were numerous, and they were separated from the ventricle only by a thin ependymal cover in some places.

The chrome-haematoxyphilous substance and the aldehyde-fuchsin-positive substance showed identical distribution in this region. Its abundance was extraordinarily high as compared with animals of other species. It occurred in profusion subependymally, in the ependymal cell interstices and also within the third ventricle. Its location was identical with that of the hyaline material demonstrated by haematoxylin. The material staining by the selective methods, i.e., by chrome-haematoxylin and aldehyde-fuchsin, partially occurred as a fine, granular mass, partially as typical Herring bodies. In the places where this selective material projected into the third ventricle through the interstices of ependymal cells, it formed club-shaped protuberances.

The location of the secretory material in the ependymal ridge of the recess seems to indicate that, in the camel, it is transferred into the third ventricle in great quantities in this area. According to some investigations, neurosecretory material could be released to a certain extent also into the third cerebral ventricle in some species[2–6]. The structure of the ependyma, which is here strikingly different from the usual ependyma in the camel, as well as in some other animals[7], might also point to such transfer. Of course, the possibility has to be considered that the secretory material observed in the third ventricle might be an artifact; but such material was also encountered in sections with absolutely intact ependymal cover. The profuse occurrence of the material around the subependymal vessels is difficult to explain except by assuming that also release of the material into the circulation occurs here, as it obviously does also in the distal part of the neurosecretory system, in the neurohypophysis[8].

Zusammenfassung. Es wird gezeigt, dass bei Kameliden das Ependym auf dem Boden des Recessus infundibularis aus platten Zellen besteht. Im Ependymbereich und in Zellinsterstitien findet sich in reichlichem Masse hyaline Masse, die durch selektive, Neurosekretion anzeigende intensive Färbung dargestellt wird. Die Lokalisation des Materials deutet auf eine Ausschüttung des Neurosekrets in den dritten Gehirnventrikel hin.

S. Talanti and E. Kivalo

Department of Anatomy, Veterinary College Helsinki (Finland), The Research Department of Rinnekoti, Institute of Mental Deficiency, Helsinki (Finland), April 18, 1961.

2 W. Bargmann and W. Hild, Acta anat. *8*, 264 (1949).
3 W. Hild, Z. Zellforsch. *35*, 33 (1950).
4 T. Stutinsky, Z. Zellforsch. *39*, 276 (1953).
5 M. Okada, T. Ban, and T. Kurotsu, Med. J. Osaka Univ. *6*, 359 (1955).
6 H. Fujita, K. Nakamura and S. Oki, Arch. hist. jap. *8*, 599 (1955).
7 F. Löfgren, Acta morph. neerl. scand. *3*, 55 (1960).
8 This work was aided by a grant from the Sigrid Jusélius Foundation. The authors are indebted to Prof. J. Anthony, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, who has kindly placed one brain for this investigation at their disposal. – Two brains were obtained from the Zoological Garden at Helsinki.

Antagonism Against the Arecoline Tremors of Oxyphenonium and its Tertiary Analogue after Intravenous and Intracerebral Administration in Mice

It is well known that the peripheral anticholinergic action of the quaternary ammonium compounds is much higher than that of their tertiary analogues. This is probably due to the great importance of the cationic 'head' in the interaction of drugs with cholinergic receptors[1–3]. Central effect of quaternary compounds is, however, much weaker than that of their tertiary analogues[4–10].

Since the specific mediator for the cholinergic receptors in the periphery as well as in the central nervous system is the quaternary fully ionized substance, acetylcholine[3,11–15] it is likely that the cationic 'head' of the drug is important for the interaction with central as well as peripherical cholinergic receptors.

It is believed that the low central effect of quaternary compounds may be explained by the difficulty with which the fully ionized quaternary compounds[13,16–23] penetrate the blood-brain barrier.

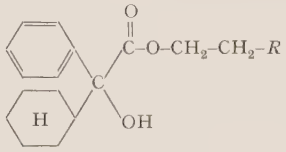
Therefore it is possible to suppose that the quaternary compounds would be at least as active on the central as on the peripheral cholinoreceptors, if they could get into the central nervous system through the blood-brain barrier[3].

It has been established in our preliminary experiments in rabbits that the quaternary analogue of nicotine, which was without convulsive effect intravenously, caused in suboccipital administration convulsions in doses even lower than those of nicotine[10].

The aim of the present report is an investigation of the central anticholinergic effects of oxyphenonium and its tertiary analogue, compound VUFB-3100, after intravenous and intraventricular administration in mice, as evidenced by the ability to prevent tremors caused by intravenous injection of arecoline[24] (Formulae).

1 H. R. Ing, G. S. Dawes, and J. Wajda, J. Pharmacol. *85*, 85 (1945).
2 R.B.Barlow, *Introduction to Chemical Pharmacology* (London 1955).
3 M. J. Michelson et al., *Physiological Role of Acetylcholine and Research of New Drugs* (in Russian), (Leningrad 1957).
4 D. Bovet and V. G. Longo, J. Pharmacol. *102*, 22 (1957).
5 F. R. Luduena and A. M. Lands, J. Pharmacol. *110*, 282 (1954).
6 E. V. Zejmal, Bjul. exp. Biol. Med. *39*, 42 (1955).
7 M. J. Michelson, V. A. Artemjev, I. V. Dardymov, E. V. Zejmal, F. V. Pevzner, E. K. Rozkova, R. C. Rybolovlev, N. V. Savatejev, J. R. Savinskij, E. P. Uspenskaja, N. V. Chromov-Borisov, and K. G. Cirk, Proc. of VIII All Union Soviet. Conf. Physiol., Biochem. and Pharmacol. (Moscow 1955).
8 R. C. Ursillo and B. B. Clark, J. Pharmacol. *114*, 54 (1955).
9 M. Vaněček and Z. Votava, Čs. Fysiol. *5*, 362 (1956).
10 E. V. Zejmal, Dissert. I. Leningrad. Med. Inst. (1958).
11 E. Bülbring and J. H. Burn, J. Physiol. *100*, 337 (1941).
12 M. J. Michelson, E. K. Rozkova, and N. V. Savatejev, Bjul. exp. Biol. Med. *37*, 7 (1954).
13 J. Eccles, R. Eccles, and P. Fatt, J. Physiol. *131*, 154 (1956).
14 W. Feldberg, *Acetylcholine*, in *Metabolism of Nervous System* (Ed. by Richter; Pergamon Press, London, N.J. 1957), p. 493.
15 M. J. Michelson, Activitas nerv. sup. *3*, in press (1961).
16 A. S. V. Burgen and L. M. Chipman, Quart. J. exp. Physiol. *37*, 61 (1951).
17 J. Eccles, P. Fatt, and K. Koketsu, J. Physiol. *126*, 524 (1954).
18 R. M. Levin and B. B. Clark, J. Pharmacol. *114*, 63 (1955).
19 W. Feldberg, J. L. Malcolm, and S. L. Sherwood, J. Physiol. *132*, 130 (1956).
20 G. B. Koelle and E. C. Steiner, J. Pharmacol. *118*, 420 (1956).
21 D. R. Curtis, J. Eccles, and R. Eccles, J. Physiol. *136*, 420 (1957).
22 W. D. M. Paton, Ann. Rev. Physiol. *20*, 431 (1958).
23 E. V. Zejmal and M. J. Michelson, Proc. of Conf. of Blood-Brain Barrier (Moscow 1960).
24 We wish to acknowledge the help of E. Adlerová from our institute for the synthesis of both compounds.

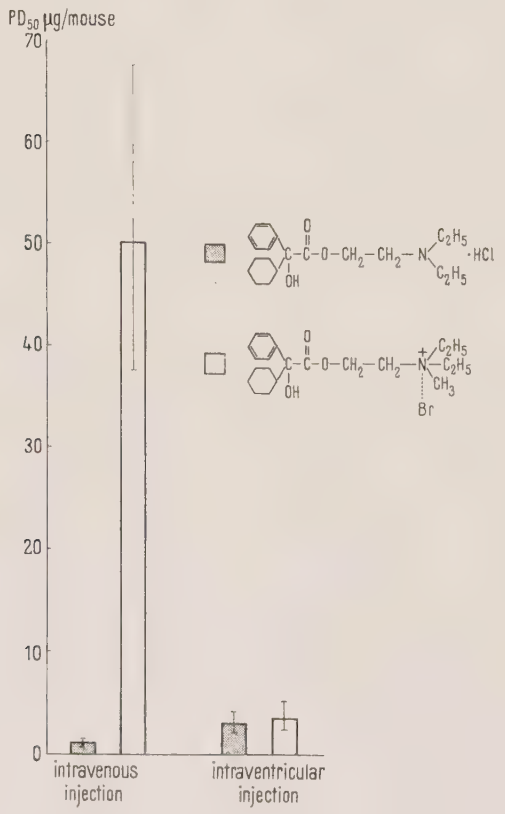
In the case of intraventricular administration, the drugs were dissolved in the Tyrode solution, coloured by addition of Evans blue and injected into the lateral cerebral ventricle in a volume of 0.01 ml, according to the method described by Haley[25], and using the apparatus constructed by Vaněček and Krebs[26]. The accuracy of the localisation of injection was always checked after each experiment. In control experiments intraventricular injection of Tyrode solution with Evans blue had no influence on arecoline tremors. The interval between the administration of the drug tested and the injection of arecoline (5 mg/kg) was 10 min in the intraventricular administration and 5 min in the intravenous administration.



Oxyphenonium $R = -N(C_2H_5)(CH_3)(C_2H_5)^+$ Br^-

VÚFB-3100 $R = -N(C_2H_5)_2$ HCl

Mode of administration	Drug injected	PD_{50}	Fiducial limits for $P = 0.05$
intravenous	oxyphenonium	2.52 mg/kg	1.88 –3.88
intravenous	VÚFB-3100	0.052 mg/kg	0.039–0.068
intraventricular	oxyphenonium	3.4 µg/mouse	2.26 –5.1
intraventricular	VÚFB-3100	2.9 µg/mouse	2.07 –4.06



Central antiarecoline effect of oxyphenonium and its tertiary analogue (compound VÚFB-3100) in intravenous and intraventricular administration. Ordinate: Dosage of the drugs in µg/mouse. White columns: oxyphenonium, shaded columns: its tertiary analogue.

The results are summarized in the Table. PD_{50}, i.e. the dose preventing the arecoline tremors in 50% of mice was 48.5 times higher for oxyphenonium in intravenous administration than that for compound VUFB-3100 (fiducial limits 32.7–72.5).

In contrast to this, there was no significant difference between the action of these drugs in administration into the cerebral ventricle.

This difference could be explained on the basis of difficult penetration through the blood-brain barrier for the fully ionized oxyphenonium. To compare the absolute values of the doses of tested drugs in intravenous and intraventricular administration, the intravenous doses were converted to µg/mouse, i.e. for 20 g of the body weight (Figure). It is conceivable that it is necessary to take this calculation with caution, since in the intravenous administration the drug is distributed in the whole body while in the intraventricular administration the whole amount of drugs comes directly into contact with the brain in a high concentration.

It is obvious that the drug injected directly into the ventricle would be effective in a smaller dose than when injected intravenously. However, as is shown in the Figure, that is true only for oxyphenonium, which was 14.8 times stronger in intraventricular administration than intravenously (fiducial limits 9–24.4). On the other hand, the compound VUFB-3100 was 2.79 times stronger intravenously than intraventricularly (fiducial limits 1.8–4.33). It is therefore possible that compound VUFB-3100, which is partly present in blood as a base and probably easily penetrates the blood-brain barrier, reaches the brain cholinergic receptors better when injected intravenously than from absorption from the inside of the ventricle.

Therefore it is likely that the wall of the ventricle, which is a certain barrier also for the penetration of the tertiary compound, will be an even greater barrier for the penetration of the quaternary oxyphenonium, which has a positive charge. It is possible that it may explain the fact why oxyphenonium injected into the ventricle has an equal effect as compound VUFB-3100 and not stronger, as in the effect on peripheric cholinoreceptors.

Zusammenfassung. Die zentrale anticholinergische Wirkung von Oxyphenonium und seinem Analogon, der Substanz VUFB-3100, die tertiären Stickstoff im Molekül enthält, wurde bei intravenöser und intraventrikulärer Applikation geprüft. Die Wirkung von Oxyphenonium war bei intravenöser Verabreichung 48,5mal schwächer als diejenige von VUFB-3100, während bei Einführung der Substanz direkt in die laterale Hirnkammer nur unbedeutende Wirkungsunterschiede erzielt werden konnten.

Die Resultate passen zur Hypothese, wonach die schwächere zentrale anticholinergische Wirkung des Oxyphenoniums wahrscheinlich mit seiner schlechten Penetration durch die hämato-enzephalische Barriere zusammenhängt.

E. V. Zejmal[27] and Z. Votava

Research Institute for Pharmacy and Biochemistry, Prague (Czechoslovakia), May 9, 1961.

[25] T. J. Haley and W. McCormick, Brit. J. Pharmacol. *12*, 12 (1957).

[26] J. Vaněček, V. Krebs, E. Scheer, and T. Bieleke, J. Amer. pharm. Ass. Sci. Ed. *49*, 178 (1960).

[27] Present address: Institute of Evolution Physiology, Leningrad (USSR).

PRO EXPERIMENTIS

Polarographic Determination of DDT

Older methods of determination of DDT, which are still in use, make use of the partial or complete dehalogenation and subsequent determination of chlorine[1–7], which is disadvantageous on account of lack of specificity.

Colorimetric methods by SCHECHTER et al.[8–10] are based in essence on nitration of DDT and formation of a tetranitroderivative, which in alkaline medium gives a blue coloration. Another colorimetric method of STIFF and CASTILLO is used less frequently, in spite of its simplicity, since methoxychlor reacts in the same way[11].

Polarographically DDT can be determined in 85% ethyl alcohol in the presence of a quaternary base[12]. It gives a well developed wave at – 0.9 V. For determination of residues in biological material, this method cannot however be used on account of the high content of by-products, which frequently cause deformations of the wave, and with regard to its relatively low sensitivity.

In view of a series of favourable results obtained in polarographic determinations of nitration or nitrosation products respectively, of various substances having significance in food and pharmaceutical practice[13–15], it was attractive to utilize the formation of nitroderivatives of DDT for polarography also. The results obtained proved this method to be useful.

Nitration is carried out with a mixture of concentrated sulphuric acid and fuming nitric acid, and proceeds optimally on heating to 90–95°C for about 10 min. After cooling, the nitration mixture is diluted with water and methyl alcohol in a quantity to attain a final concentration of 50% minimum. In this strongly acidic medium the tetranitroderivative is reduced to a single well developed and readable wave (half wave potential in a 20% nitration acid mixture in 50% methyl alcohol – 0.13 V sat. calomel electrode).

The wave shows a diffuse character and is suitable for analytical evaluation (Figure).

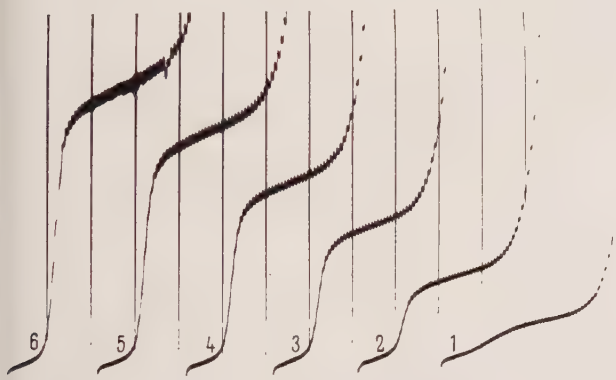
The advantage of this newly elaborated polarographic determination of DDT compared with the colorimetric determination, lies in the possibility of using an acid medium directly. By its extraordinary high sensitivity and easy operation it surpasses all other methods, especially that of direct polarographic determination of DDT.

The principle of the present method, the behaviour of the pure tetranitroderivative, the precise working procedure of the nitration and its application in determinations of DDT residues in materials of biological character will be described elsewhere.

Zusammenfassung. Es wird eine schnelle, hochempfindliche polarographische Bestimmung von DDT beschrieben und das durch Nitrieren von DDT erhältliche Tetranitroderivat zur Polarographie verwendet.

J. DAVÍDEK and G. JANÍČEK

Department of Food Chemistry and Control, Chemical Technology University, Prague (Czechoslovakia), April 24, 1961.



Calibration polarogram of DDT. Resulting concentration of the 20% nitration mixture in 50% methyl alcohol. Concentration of DDT: (1) 0; (2) 0.2; (3) 0.4; (4) 0.6; (5) 0.8; (6) $1 \cdot 10^{-4} M$. Mercurosulfate electrode, sensitivity 1:20; 198 mV/Absc. Performed according to the working procedure described in the text.

[1] A. STĚPANOV, Ber. chem. Ges. *39*, 4056 (1806).
[2] H. NOMNIK, Analyst *82*, 378 (1927).
[3] F. W. PHILLIPS and M. E. DE BENEDICTIS, J. agr. Food Chem. *2*, 1226 (1954).
[4] F. A. GÜNTHER, Ind. eng. Chem., Anal. Ed. *17*, 149 (1945).
[5] J. DESHUSSES and P. DESVANNES, Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg. *41*, 381 (1950).
[6] V. J. KUZNĚCOV, Doklady Akad. Nauk SSSR *77*, 261 (1951).
[7] V. JEDLIČKA and V. ČERNÁ, Rev. czech. Med. *3*, 149 (1947).
[8] M. S. SCHECHTER and H. L. HALLER, J. Amer. chem. Soc. *66*, 2129 (1944).
[9] M. S. SCHECHTER, S. B. SOLOWAY, R. A. HAYES, and H. L. HALLER, Ind. eng. Chem., Anal. Ed. *17*, 704 (1945).
[10] M. S. SCHECHTER, M. A. POGORELSKIN, and H. L. HALLER, Anal. Chem. *19*, 51 (1947).
[11] H. A. STIFF and J. C. CASTILLO, Science *101*, 440 (1945).
[12] H. KELLER, M. HOCHWEBER, and H. HALBAN, Helv. chim. Acta *29*, 761 (1946).
[13] E. DAVÍDKOVÁ and J. DAVÍDEK, Z. Lebensm. Untersuch. Forsch. *111*, 477 (1960).
[14] J. DAVÍDEK and O. MANOUŠEK, Čsl. farmac. *7*, 73 (1958).
[15] J. DAVÍDEK and O. MANOUŠEK, Čsl. farmac. *7*, 399 (1958).

Mikrobiologischer Nachweis von Antibiotika auf Dünnschichtchromatogrammen

Der Antibiotika-Fachmann ist insbesondere daran interessiert, festzustellen, wieviele und was für mikrobiologisch wirksame Fraktionen in einem natürlichen Gemisch vorliegen. Aus diesem Grund haben wir eine mikrobiologische Sichtbarmachung von auf dünnen Schichten von Silicagel G und Silicagur G (Merck AG) getrennten Antibiotika mit *Sarcina lutea* und *Bacillus subtilis* bei Gegenwart von Triphenyltetrazoliumsalzen entwickelt[1] welche hier kurz geschildert werden soll.

Die chromographierten Platten werden zu diesem Zweck in einen Halter aus Plexiglas eingebettet und mit einer Schicht Agar zugedeckt, welche mit dem geeigneten Mikroorganismus und einer kleinen Menge Triphenyltetrazoliumsalz eingeimpft ist. Nach beendeter Entwicklung in einem Brutkasten ist die Schicht dort wo der Mikroorganismus normal wachsen konnte intensiv rotbraun gefärbt, während dort wo das Antibiotikum vorhanden ist,

[1] B. J. R. NICOLAUS, C. CORONELLI und A. BINAGHI, Il Farmaco *16*, 349 (1961).

hellgelbe Hemmungszonen sichtbar sind. Die rotbraune Farbe rührt von der Reduktion von Triphenyltetrazoliumsalz ins zugehörige Formazan her. 6-Aminopenicillansäure, welche mikrobiologisch unwirksam ist, wurde auf der Platte vor der Sichtbarmachung ins aktive Benzylpenicillin (Penicillin G) verwandelt. Direkt nachweisbar sind: Penicillin V und G, 2,6-Dimethoxybenzylpenicillin, 6-Aminopenicillansäure, Tetracyclin, Anhydrotetracyclin, Hydroxytetracyclin, Chlorotetracyclin, Demethyltetracyclin, Anhydrodemethyltetracyclin, Desoxytetracyclin, Anhydrochlorotetracyclin und Rifomicin B, O, S und SV.

Summary. Numerous tetracyclines, penicillins and ri fomycins on thin layer chromatograms may be detecte by microbiological development with *Sarcina lutea* an *Bacillus subtilis* in the presence of triphenyltetrazoliu salts. This technique is exceptionally sensitive (0.01–0.1γ) the inhibition zones being much sharper than on pape chromatograms.

B. J. R. NICOLAUS, C. CORONELLI und A. BINAGH

Laboratori di Ricerca della Lepetit S.p.A. Milano (Italien), 22. Juni 1961.

A Simple Detection of Fat-Soluble Vitamins on Alumina Thin Layer-Chromatograms

For the detection of fat-soluble vitamins after chromatographic separation on thin alumina layer, 70% perchloric acid and 98% sulfuric acid proved to be useful. Similar reactions have been previously described[1–5] and some have even been used for colorimetric determination. A survey of colours given by individual fat-soluble vitamins (Vitamin and provitamins A, vitamin D_2, E, K_1, K_2, K_3) is listed in the Table. The method is advantageous because of the stability of the reaction products and because alumina itself gives no coloration with the agents mentioned. The application of the acids is performed in such a way that the chromatograms after the development are first air-dried and then the acid is made to soak into the alumina layer in a direction perpendicular to that of the previous development (a technique similar to the proper chromatography). The coloration is visual immediately in the wet state, but its intensity decreases slowly (6 h). This method proved valuable, since no destruction of the alumina layer takes place as in case of the spraying technique.

Colour reactions of fat-soluble vitamins with some acids

Vitamin	70% perchloric acid	98% sulfuric acid
A	violet	blue violet
D_2	orange brown	orange red
E	brown	brown
K_1	yellow brown	yellow brown
K_2	yellow brown	yellow brown
K_3	yellow brown	yellow brown
Provitamins A	blue	blue

Zusammenfassung. Unter Verwendung von 70prozentiger Perchlorsäure und 98prozentiger Schwefelsäure wurde eine einfache Technik zur Detektion der fettlöslichen Vitamine auf Aluminiumoxyd-Dünnschicht-Chromatogrammen ausgearbeitet.

J. BLATTNÁ and J. DAVÍDEK

Central Research Institute of Food Industry, Prague, and Department of Chemistry and Control of Food Institute of Chemical Technology, Prague (Czechoslovakia), March 21, 1961.

[1] A. E. PACINI and M. H. TARAS, J. Amer. pharm. Assoc. *26*, 72 (1937).
[2] P. FLESH, Proc. Soc. exp. Biol. Med. *84*, 148 (1953).
[3] F. ČUTA and J. ČELIKOVSKÝ, Chem. Listy *48*, 1346 (1954).
[4] S. UENO, Ind. Eng. Chem. *7*, 596 (1915).
[5] E. D. ROBIN, Science *102*, 17 (1945).

Eine einfache Methode zur Gewinnung von Exuvialflüssigkeit bei der Honigbiene (*Apis mellifica* L.)

Die Exuvialflüssigkeit, welche beim Häutungsvorgang der Insekten von den Epidermiszellen in den entstehenden Spaltraum zwischen Matrix und Cuticula abgeschieden wird und durch ihre Fermente (Chitinasen und Proteinasen) die alte Endocuticula von innen her auflöst, ist meines Wissens bis jetzt nur bei der Wanze *Rhodnius prolixus*[1,2], beim Mehlkäfer (*Tenebrio molitor*)[3], dem Riesenseidenspinner (*Platysamia cecropia*)[4] und beim Maulbeerspinner (Bombyx mori)[5,6] untersucht worden. Der Grund mag wohl der sein, dass die Gewinnung einer genügenden Menge dieses Sekretes für die biochemische Untersuchung im allgemeinen sehr schwierig ist.

Ich bin in der Lage, hier eine einfache Methode zu beschreiben, welche gestattet, bei Arbeiterinnen- und Drohnenlarven der Honigbiene grössere Mengen von Exuvialflüssigkeit zu gewinnen. Das Verfahren beruht auf der Beobachtung, dass die normale Verpuppung der Biene nicht nur von der Tätigkeit der endokrinen Organe, sondern auch vom Vorhandensein des Larvengespinstes (Kokon) abhängig ist[7–10]. Ohne dieses Gespinst oder eine Unterlage von gleichwertiger Oberflächenbeschaffenheit tritt die letzte Larvenhäutung, das heisst die Häutung der Larve zur Puppe entweder gar nicht ein oder verläuft regelwidrig, so dass höchstens mehr oder weniger verkrüppelte und lebensunfähige Imagines entstehen. Man kann sich davon leicht überzeugen, wenn man ausgewachsene

[1] V. B. WIGGLESWORTH, Quart. J. micr. Sci. *76*, 270 (1933).
[2] V. B. WIGGLESWORTH, *The Principle of Insect Physiology* (Methuen & Co. Ltd., London 1950), p. 32.
[3] CH. JEUNIAUX, Arch. int. Physiol. Biochim. *63*, 114 (1955).
[4] J. V. PASSONNEAU und C. M. WILLIAMS, J. exp. Biol. Med. *30*, 545 (1953).
[5] Y. HAMAMURA, S. JIDA und M. OTSUKA, Bull. agric. Chem. Soc. Japan *16* (1940).
[6] CH. JEUNIAUX und M. AMANIEU, Arch. int. Physiol. Biochim. *63*, 94 (1955); Exper. *11*, 195 (1955).
[7] A. V. VELICH, Z. wiss. Zool. *136*, 210 (1930).
[8] W. FYG, Mitt. Schweiz. entomol. Ges. *29*, 317 (1956).
[9] W. FYG, Insectes sociaux *4*, 327 (1957).
[10] W. FYG, Schweiz. Bztg. *81*, 387 (1958).

Bienenlarven kurz nach der Beendigung des Spinnens als junge Streckmaden vorsichtig aus den bedeckelten Waben-zellen und damit aus ihrem Kokon nimmt und sie im Brutschrank bei einer Temperatur von 34,5–35° C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 40–60% in flachen Glasschalen aufzieht. Bei allen Streckmaden beginnt in diesem Fall nach 12–24 h ganz normal eine Abscheidung von Exuvialflüssigkeit unter der sich allmählich abhebenden Cuticula. Parallel mit der nun einsetzenden Gliederung des Larvenkörpers nimmt sie rasch zu und erfolgt bei vielen Tieren so überaus reichlich, dass der Körper, vor allem am analen Ende, bald einmal von einem abnorm grossen transparenten Flüssigkeitssack umhüllt wird (Figur). Die Larvenexuvie wird aber häufig nicht abgestreift und die Entwicklung bleibt dann auf diesem Stadium der Metamorphose stehen. Durchsticht man jetzt die dünne, durchsichtige Larvenhaut auf der Dorsalseite zwischen Thorax und Abdomen oder terminal mit einer feinen Glaspipette, so lässt sich die klare, farblose Häutungsflüssigkeit ohne Schwierigkeit vollkommen rein absaugen. Eine Arbeiterinnenlarve liefert etwa 0,2–0,3 ccm, eine Drohnenlarve 0,4–0,5 ccm Sekret. Allzulange darf man mit der Gewinnung der Exuvialflüssigkeit jedoch nicht zuwarten, da sich die Larvenhaut nach 2–3 Tagen in der Regel zu bräunen und das Sekret sich zu trüben beginnt. Die Trübung ist vorwiegend auf das Eindringen von Fettkörperzellen in die Häutungsflüssigkeit zurückzuführen. Ich vermute, dass die Fermente der aufgestauten Exuvialflüssigkeit besonders auf der Ventralseite des Abdomens die neugebildete Cuticula auflösen und so die Infiltration bewirken.

Da man im Frühling und Sommer jedem normalen Bienenvolk ohne Mühe geeignete Arbeiterinnen- und Drohnenlarven in grosser Zahl entnehmen kann, dürfte es nunmehr leicht sein, auf diese Weise eine genügende Menge Exuvialflüssigkeit für die biochemische Untersuchung zu gewinnen.

In Verwandlung begriffene Drohnenlarve mit grossem Exuvialflüssigkeitssack.

Summary. A simple method is described for obtaining the ecdysial fluid of the honeybee. For this purpose, full-grown worker and drone larvae are taken out of the cells and their cocoons as young prepupae shortly after termination of spinning. They are raised at a temperature of 34.5° to 35° C. The secretion of the moulting fluid begins 12 to 24 h later in all larvae which are ready to pupate. In larvae without a cocoon, the casting of the old cuticle does often not occur, or is incomplete. The secretion gathers abundantly in the body region under the larval skin and can be sucked off without difficulty with fine glass pipettes in a completely pure state for the biochemical analysis.

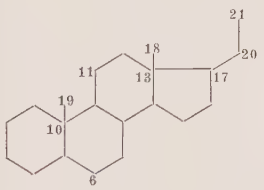
W. Fyg

Bienenabteilung der Eidg. milchwirtschaftlichen Versuchsanstalt Liebefeld, Bern (Schweiz), 5. Juli 1961.

STUDIORUM PROGRESSUS

Neue Substitutionsreaktionen bei Steroiden[1,2]

Die Einführung von funktionellen Gruppen und insbesondere von Sauerstoffunktionen in der Seitenkette und an den sekundären und tertiären Kohlenstoffatomen des Ringgerüstes von Steroiden bietet im allgemeinen keine grossen Schwierigkeiten. Sie kann in allen Fällen über



aktivierende Nachbargruppen wie Ketone, Doppelbindungen und dgl. erreicht werden. Anders liegen die Verhältnisse bei den angulären Methylgruppen C-18 und C-19, wo dieser Angriffsweg durch die quartäre Natur der Haftstellen C-10 und C-13 verschlossen ist. Gerade die 18- und 19-oxygenierten Steroide haben aber, einerseits im Zusammenhang mit der Partialsynthese von Aldosteron[3], anderseits als Ausgangsstoffe für die Herstellung von 19-Nor-steroiden vermehrtes Interesse gewonnen. Reaktionen, die zur Substitution dieser nicht aktivierten Methylgruppen führen, sind insbesondere im organisch-chemischen Laboratorium der Eidg. Techn. Hochschule[4], aber auch an andern Orten bearbeitet worden. So konnten 18- bzw. 19-substituierte Steroide, zum Beispiel durch Zersetzung von N-Chlor-20-aminosteroiden oder 21-Diazoverbindungen, durch Bestrahlung von 20-Ketonen, durch Spaltung von 6β-[5] oder 20-Bleialkoholaten[4,6] und durch die von Barton[7] untersuchte photochemische Zersetzung von 6β-, 11β- und 20-Nitritestern hergestellt werden.

[1] Vorgetragen von Ch. Meystre am 23. 9. 61 anlässlich der Sommerversammlung der Schweiz. Chem. Gesellschaft in Biel (vgl. Chimia *15*, (1961), im Druck).

[2] Über Steroide 180. Mitteilung. 179. Mitt. vgl. A. Wettstein, Exper. *17*, 329 (1961).

[3] Vgl. K. Heusler, J. Kalvoda, Ch. Meystre, P. Wieland, G. Anner, A. Wettstein, G. Cainelli, D. Arigoni und O. Jeger, Helv. chim. Acta *44*, 502 (1961) und frühere Literatur daselbst.

[4] K. Schaffner, D. Arigoni und O. Jeger, Exper. *16*, 169 (1960).

[5] A. Bowers, L. C. Ibanez, E. Cabezas und H. J. Ringold, Chem. and Ind. *1960*, 1299.

[6] Vgl. G. Cainelli, B. Kamber, J. Keller, M. Lj. Mihailovic, D. Arigoni und O. Jeger, Helv. chim. Acta *44*, 518 (1961).

[7] (a) D. H. R. Barton, J. M. Beaton, L. E. Geller und M. M. Pechet, J. Amer. chem. Soc. *82*, 2640 (1960). – (b) D. H. R. Barton und J. M. Beaton, J. Amer. chem. Soc. *82*, 2641 (1960). – (c) A. L. Nussbaum, F. E. Carlon, E. P. Oliveto, E. Townley, P. Kabasakalian und D. H. R. Barton, J. Amer. chem. Soc. *82*, 2973 (1960).

Schon BARTON[7a] hat darauf hingewiesen, dass die letztere Reaktion nach dem Schema

verlaufen dürfte und dass an Stelle von X = NO auch andere Gruppen, zum Beispiel Halogene, treten könnten. Die kürzliche Mitteilung über die analog verlaufende photochemische Umlagerung von tertiären Hypochloriten der Steroidreihe[8] veranlasst uns, über einige in den letzten zwei Jahren in unseren Laboratorien durchgeführten Untersuchungen zu berichten[9].

Bleialkoholate, die durch Einwirkung von Bleitetraacetat auf 20-Hydroxy-pregnane entstehen, liefern bei der thermischen Zersetzung Nebenprodukte, welche das Entstehen eines 20-Sauerstoffradikals als Zwischenprodukt der Umwandlung in 18,20-Äther äusserst wahrscheinlich machten[6]. Obwohl der genaue Verlauf der Reaktion noch nicht abgeklärt ist, konnte vermutet werden, dass vor dem Ringschluss zum Äther Zwischenprodukte mit C-Radikalcharakter[10] auftreten, die sich unter Umständen mit «Radikalfängern» nachweisen lassen. Wir wählten zu diesem Zweck Jod, das sich in atomarer Form äusserst schnell mit Radikalen verbindet[14]. Jod reagiert aber in der Wärme auch mit dem Reagens Bleitetraacetat zum Beispiel in Cyclohexan (insbesondere unter Belichtung mit Licht von einer Wellenlänge um 520 mμ, das heisst im Gebiet der Hauptabsorptionsbande von Jod) unter Bildung von Bleidiacetat, Kohlendioxyd und Methyljodid[15], die nachgewiesen werden konnten. Als Zwischenprodukt könnte Acetylhypojodit auftreten. Letzteres dürfte aber in unserem Fall auch mit dem 20-Hydroxypregnan reagieren unter Bildung eines 20-Hypojodits. Dieses Zwischenprodukt wäre identisch mit dem bei der Reaktion des Bleialkoholats mit Jod zu erwartenden Hypojodit[16] und würde ein 20-Sauerstoff-Radikal[17] bilden, wie es auch aus dem Bleialkoholat durch thermische, homolytische Spaltung entsteht. *Der eigentliche Reaktionsverlauf bis zur Ausbildung des Sauerstoff-Radikals wäre also für unsere Problemstellung von untergeordneter Bedeutung.*

In Bestätigung dieser Annahme erhielten wir weitgehend die gleichen Reaktionsprodukte bei der Umsetzung von Steroidalkoholen in apolaren Lösungsmitteln mit Jod zusammen mit einem der Reagentien Bleitetraacetat, Quecksilber-II-acetat, Silberacetat, N-Jod- oder N-Bromsuccinimid. Die Umsetzungen mit Blei-IV- und Quecksilber-II-acetat lieferten im allgemeinen höhere Ausbeuten als diejenigen mit den anderen Reagentien. Die Reaktionen wurden bei ca. 80° durchgeführt (Cyclohexan oder Tetrachlorkohlenstoff beim Siedepunkt). In gewissen Fällen scheint die Zersetzung durch atomares Jod, welches durch Bestrahlen der Reaktionslösung mit sichtbarem Licht entsteht, katalysiert zu werden[20].

Die ersten Versuche wurden am 3β-Acetoxy-20β-hydroxy-5α-pregnan[21] (Ia) durchgeführt. Beim Erhitzen von Ia mit überschüssigem Bleitetraacetat und Jod im Molverhältnis 1:1 bei Tageslicht entstand ein Rohprodukt, welches ein sehr labiles Jodatom enthielt und durch Natriumacetat in wässrigem Eisessig in ein jodfreies, rohes Hydroxyacetat überging. Letzteres liess sich zu einem hydroxylfreien Diacetat $C_{25}H_{38}O_5$ acetylieren oder mit Chromtrioxyd-Pyridin zum Lakton der Formel IIIa oxydieren[22]. Für die labile Jodverbindung, das Hydroxyacetat und das Diacetat, ergeben sich somit die Formeln IIa, b und c.

Die gleiche Reaktionsfolge liess sich auch am Δ^5-3,3-Aethylendioxy-11α-acetoxy-20β-hydroxypregnen (VII)[23] durchführen. Durch Behandlung des rohen Jodacetals VIIIa mit Natriumacetat und Dimethylformamid und milde Verseifung mit Kaliumkarbonat erhielt man das rohe Hemiacetal VIIIb, welches bei der Oxydation mit Chromsäure-Pyridin das Lakton IX[24] in einer Ausbeute von 60–65% (bezogen auf VII) lieferte.

Die oben beschriebenen Reaktionen stellen eine *direkte Umwandlung der C-18-Methylgruppe in eine Aldehyd- bzw. Carboxylgruppe* dar.

In analoger Weise ging die 11α-Acetoxy-Verbindung Ib[25] mit überschüssigem Bleitetraacetat und Jod in das rohe Jodacetal IIe über, das durch Oxydation mit Silber

[8] M. AKHTAR und D. H. R. BARTON, J. Amer. chem. Soc. *83*, 2215 (1961).

[9] Experimentelle Angaben werden in Helv. chim. Acta veröffentlicht.

[10] Eine Ätherbildung durch Radikalsubstitution, ausgehend von einem O-Radikal unter Ausstossung eines Wasserstoffatoms, ist energetisch ungünstig und unseres Wissens nie nachgewiesen worden. Äther können sich aus Sauerstoffradikalen durch Kombination mit einem C-Radikal bilden[11,12]. Auch die Substitution mit einem C-Radikal unter gleichzeitiger Spaltung einer Peroxybindung kann zum Äther führen[13].

[11] P. GRAY und A. WILLIAMS, Chem. Rev. *59*, 239 (1959).

[12] P. R. STORY, J. Amer. chem. Soc. *82*, 2085 (1960).

[13] H. E. DE LA MARE und F. F. RUST, J. Amer. chem. Soc. *81*, 2691 (1959).

[14] A. PERRET und R. PERROT, Helv. chim. Acta *28*, 558 (1945). – G. S. HAMMOND und L. M. SOFFER, J. Amer. chem. Soc. *72*, 3737, 4711 (1950). – DELOS F. DETAR und R. C. LAMB, J. Amer. chem. Soc. *81*, 122 (1959).

[15] R. G. JOHNSON und R. K. INGHAM, Chem. Rev. *56*, 219 (1956).

[16] Alkylhypojodite sind bisher, im Gegensatz zu Acylhypojoditen (J. W. H. OLDHAM und A. R. UBBELOHDE, J. Chem. Soc. *1941*, 368), nicht isoliert worden; es finden sich aber in der Literatur verschiedene Reaktionen, bei denen sie als Zwischenprodukte postuliert werden können (vgl. M. ANBAR und D. GINSBURG, Chem. Rev. *54*, 925 (1954)), insbesondere die Reaktion von Alkoholen mit Quecksilberoxyd und Jod.

[17] Die Zersetzung von tertiären Alkylhypochloriten zur Herstellung von Alkoxyradikalen ist wohl bekannt [vgl. [11] und [18] sowie neuerdings (a) F. D. GREENE, J. Amer. chem. Soc. *81*, 2688 (1959). – (b) F. D. GREENE, M. L. SAVITZ, H. H. LAU, F. D. OSTERHOLTZ und W. N. SMITH, J. Amer. chem. Soc. *83*, 2197 (1961). – (c) C. WALLING und B. B. JACKNOW, J. Amer. chem. Soc. *82*, 6108, 6113 (1960). – (d) M. AKHTAR und D. H. R. BARTON[8]].
Bei sekundären und primären Alkylhypochloriten ist der Zerfall in Carbonylverbindungen die Hauptreaktion[19]. Es scheint sich dabei eher um einen heterolytischen Zerfall zu handeln. Die bei der Zersetzung von Peroxyden, Nitriten oder Nitraten zu sekundären und primären Alkoxyradikalen gebildeten Carbonylverbindungen werden auf Disproportionierungsreaktionen und nur in Ausnahmefällen auf die Ausstossung eines Wasserstoffatoms zurückgeführt[11]. Da zur Disproportionierung eine Kollision zweier Moleküle notwendig ist, tritt diese Reaktion gegenüber dem intramolekularen Entzug von Wasserstoff zurück (vgl. [7]).

[18] C. WALLING, *Free Radicals in Solution* (J. Wiley and Sons Inc., New York 1957).

[19] C. WALLING und A. PADWA, J. Amer. chem. Soc. *83*, 2207 (1961).

[20] Vgl. F. W. LAMPE und R. M. NOYES, J. Amer. chem. Soc. *76*, 2140 (1954).

[21] W. KLYNE und D. H. R. BARTON, J. Amer. chem. Soc. *71*, 1500 (1949).

[22] IIIa ist inzwischen auch von D. H. R. BARTON[7a] und von L. LÁBLER (Coll. Czech. chem. Comm. *26*, 724 (1961)) beschrieben worden.

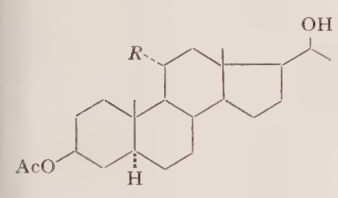
[23] K. HEUSLER, J. KALVODA, P. WIELAND und A. WETTSTEIN, Helv. chim. Acta *44*, 179 (1961).

[24] Die Struktur dieser Verbindung ist durch die Umwandlung in Aldosteron-Zwischenprodukte gesichert (vgl. K. HEUSLER, P. WIELAND und A. WETTSTEIN, Helv. chim. Acta *44*, 1374 (1961)).

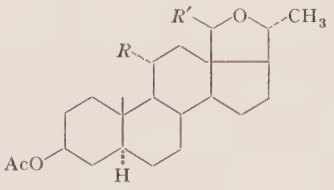
[25] Hergestellt durch katalytische Hydrierung des entsprechenden 20-Ketons (C. DJERASSI, E. BATRES, J. ROMO und G. ROSENKRANZ, J. Amer. chem. Soc. *74*, 3634 (1952)) mit Platin in Eisessig: F. 165–166°; $[\alpha]_D^{25} = -31°$ (in Chloroform).

chromat und Chromsäure-Schwefelsäure in Aceton das Lakton IIIb in 70–80% Gesamtausbeute lieferte. Reduzierte man bei der Behandlung von Ib mit Bleitetraacetat die Reaktionszeit soweit, dass nur ein Teil von Ib umgesetzt wurde, so entstand ein Rohprodukt, welches das Jodhydrin Va enthielt; es liess sich nämlich einerseits mit Silberacetat in den Äther IId[26], andererseits mit Chromsäure-Schwefelsäure in das kristallisierte Jodketon Vb[27] und durch anschliessende Behandlung mit Silberacetat in wässrigem Dimethylformamid in das hemiketalisierte Hydroxyketon VI überführen[28]. Bei Verwendung von Quecksilber-II-acetat oder Silberacetat und Jod wurde aus Ib nach Oxydation neben den Produkten IId, IIIb und Vb stets auch eine stabile Jodverbindung isoliert, welcher auf Grund der Analyse die Struktur IVa zukommen dürfte[29].

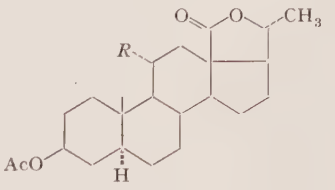
Ähnlich wie Ia, Ib und VII wurden unter anderem auch die 20β-Hydroxy-Verbindungen Xa-d in Ausbeuten von 45–80% in die entsprechenden 18,20-Laktone XIa-d übergeführt.



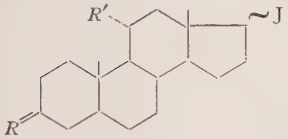
Ia R = H
Ib R = OAc

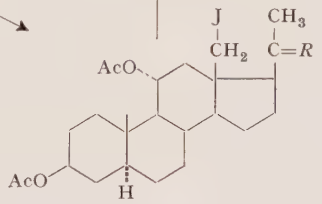


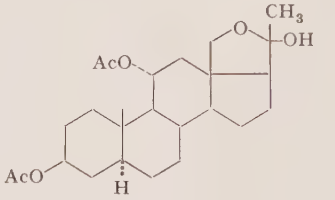
IIa R = H; R' = J
IIb R = H; R' = OH
IIc R = H; R' = OAc
IId R = OAc; R' = H
IIe R = OAc; R' = J



IIIa R = H
IIIb R = OAc







IVa R = ; R' = OAc

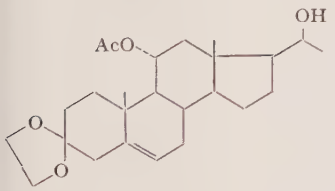
IVb Δ^5; R = ; R' = H

IVc Δ^5; R = ; R' = H

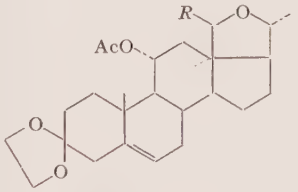
Va R =

Vb R = O

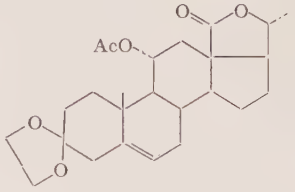
VI



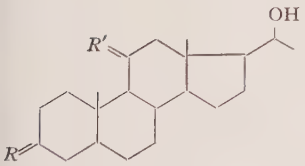
VII

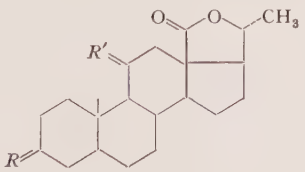


VIIIa R = J
VIIIb R = OH



IX





		R	R'	
Xa[30]	Δ^5		H_2	XIa
Xb[30]	Δ^5		H_2	XIb
Xc[23]	Δ^4	=O		XIc
Xd[3]	5β			XId

[26] IId konnte auch durch Bleitetraacetat-Behandlung von Ib in Methylcyclohexan hergestellt werden.

[27] Vb konnte durch Umkristallisieren nicht von dem durch Oxydation von unverändertem Ib gebildeten 20-Keton getrennt werden. Das Rohkristallisat schmolz bei ca. 115–118° (Zers.).

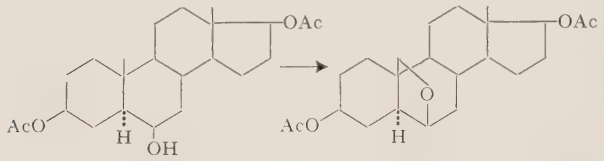
[28] In analoger Weise wurde aus dem 20-Hydroxy-ketal Xb das bekannte 18-Hydroxy-progesteron (F. Buzzetti, W. Wicki, J. Kalvoda und O. Jeger, Helv. chim. Acta *42*, 388 (1959)) hergestellt.

[29] Vgl. die Entstehung einer 17α-Acetoxy-androstan-verbindung bei der Bleitetraacetat-Behandlung des 3β-Acetoxy-20-methyl-20-hydroxy-5α-pregnans in Cyclohexan[6].

[30] Die Verbindungen Xa und b wurden durch Reduktion der entsprechenden 20-Ketone mit Natriumborhydrid hergestellt.

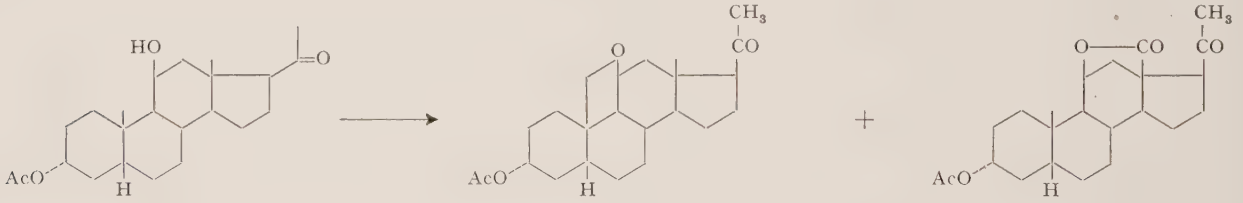
Über weitere Umwandlungen dieser Verbindungen, insbesondere über ihre Bedeutung für die Synthese von Aldosteron, soll später berichtet werden.

Im folgenden wurde anstelle von 20β-Hydroxy-Steroiden das Verhalten von 6β-Hydroxy- und 11β-Hydroxy-Derivaten untersucht. Ausgehend von 3β,17β-Diacetoxy-6β-hydroxy-5α-androstan (XII)[31] konnte durch Oxydation mit allen eingangs genannten Reagentien in Gegenwart von Jod[32] als Reaktionsprodukt in Ausbeuten bis zu 90% das 3β,17β-Diacetoxy-6β,19-oxido-5α-androstan (XIII) gewonnen werden. Trotz der Anwesenheit von überschüssigem Jod liess sich hier kein halogenhaltiges Zwischenprodukt isolieren. Verbindung XIII ist mit dem aus XII durch Bleitetraacetat-Behandlung in Benzol[5] gewonnenen Reaktionsprodukt identisch.



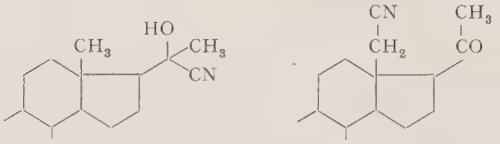
XII XIII

Das 3α-Acetoxy-11β-hydroxy-20-oxo-5β-pregnan (XIV)[33] verhielt sich ähnlich wie XII. Es lieferte bei der Behandlung mit Bleitetraacetat und Jod als Hauptprodukt (in ca. 35% Ausbeute) den 11β,19-Äther XV[34,36] neben einer kleinen Menge (ca. 5%) des Laktons XVI. Die Konstitution von XVI liess sich durch eine unabhängige Synthese aus dem 18,20 Lakton XId sicherstellen. Auch bei der Umwandlung von XIV konnte also kein jodhaltiges Zwischenprodukt isoliert werden, obwohl die Entstehung des Laktons XVI zeigt, dass in untergeordnetem Masse auch von der 11β-Hydroxygruppe aus dieselbe Reaktionsfolge ablaufen kann wie bei 20-Hydroxy-Verbindungen[37].



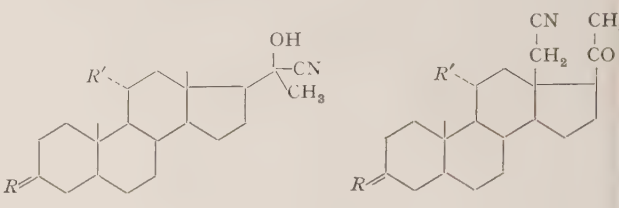
XIV XV XVI

Eine besonders interessante Reaktion beobachteten wir bei der Behandlung von 20-Cyanhydrinen vom Typus XVII mit Jod und den oben erwähnten Schwermetallsalzen. Hier konnten keine dem Jodhydrin Va oder Jodacetal IIe entsprechende Verbindungen nachgewiesen



XVII XVIII

werden, hingegen erfolgte eine intramolekulare Substitution[38] durch die Cyanidgruppe unter Bildung von Produkten von Typus XVIII. Die Struktur der Endprodukte ergab sich aus den analytischen Daten und vor allem aus den Kernresonanzspektren, in denen das Signal der C-18-Methylgruppe fehlte. Die Reaktion wurde an folgenden Beispielen ausgeführt, wobei die Cyanoketone in Ausbeuten bis 50% erhalten wurden.



		R	R'	
XVIIa[39]	Δ^5	OAc, H	H	XVIIIa
XVIIb[40]	Δ^5	O, O	H	XVIIIb
XVIIc[41]	5α	OAc, H	H	XVIIIc
XVIId[41]	5α	OAc, H	OAc, H	XVIIId
XVIIe[40]	Δ^4	=O	H	XVIIIe

Die physikalischen Daten der neuen Verbindungen sind in der Tabelle zusammengestellt.

[31] D. L. GARMAISE und C. W. SHOPPEE, J. Chem. Soc. *1953*, 245.

[32] Das unterschiedliche Verhalten der 20β- und 11β-Hydroxyverbindungen mit Bleitetraacetat allein und unter Jodzusatz deutet darauf hin, dass auch bei XII die Reaktion in Gegenwart von Jod nicht dieselbe ist wie ohne Jod (vgl. die Ausbeuteunterschiede).

[33] E. P. OLIVETO, T. CLAYTON und E. B. HERSHBERG, J. Amer. chem. Soc. *75*, 486 (1953).

[34] Die Konstitution XV ziehen wir derjenigen des isomeren 11β,18-Äthers vor, da letztere auf Grund des NMR-Spektrums[35] unwahrscheinlich ist. Ein direkter Beweis ist noch erforderlich. Möglicherweise enthält der nichtkristallisierte Teil des hydroxylfreien Reaktionsproduktes auch den 11β,18-Äther sowie in Spuren das zu XVI isomere 11β,19-Lakton.

[35] Aufnahme und Interpretation dieser Spektren verdanken wir Herrn Dr. R. F. ZÜRCHER in unsern physikalischen Laboratorien.

[36] Mit Bleitetraacetat allein bildet sich (durch heterolytischen Zerfall des Bleiesters) das 11-Keton (vgl. [27]); bei 11β-Hydroxy-18,20-äthern erhält man hingegen die 11β,18;18,20-Bisoxydo-verbindungen (P. F. BEAL und J. E. PIKE, Chem. and Ind. *1960*, 1505).

[37] Unter den angewandten Reaktionsbedingungen bleiben die 6β,19- und 18,20-Äther unangegriffen.

[38] Als Nebenreaktion wurde auch hier die 17,20-Bindung gespalten, wie die Bildung der 17-Jodide IVb und IVc zeigte.

[39] L. H. SARETT, J. Amer. chem. Soc. *70*, 1454 (1948).

[40] A. ERCOLI und P. DE RUGGIERO, Gazetta chim. ital. *84*, 312 (1954).

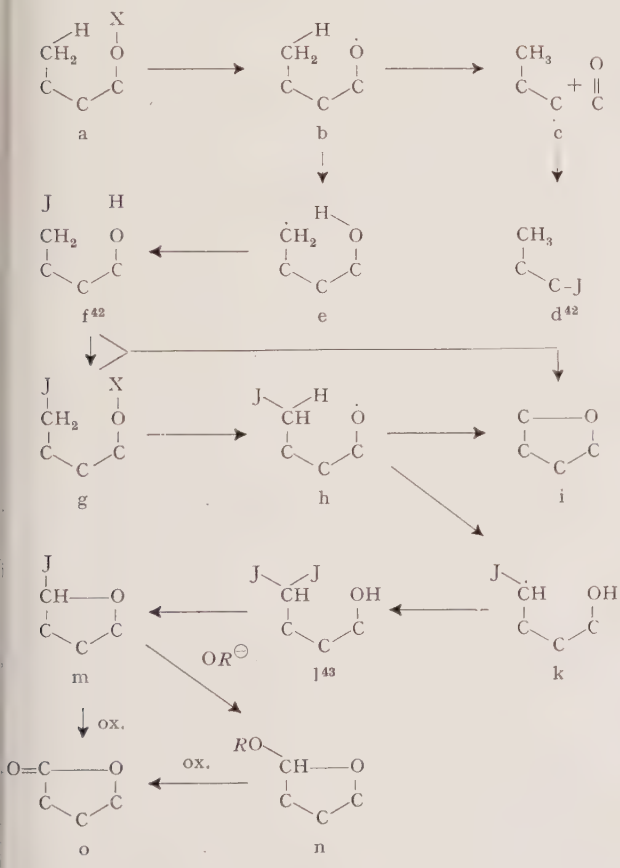
[41] Diese Cyanhydrine wurden in der üblichen Weise aus den entsprechenden 20-Ketonen hergestellt.

Eigenschaften der hergestellten neuen Verbindungen[a]

No.	Bruttoformel	Smp.	Krist. aus	$[\alpha]_D$[b]	Zusammensetzung % C	% H	
IIc	$C_{25}H_{38}O_5$	141–144°	Petroläther	+ 41°	71,98 (71,74)	9,15 (9,15)	
IId	$C_{25}H_{38}O_5$	141–142°	Äther-Petroläther	– 22°	71,72 (71,74)	8,97 (9,15)	
IIIb	$C_{25}H_{36}O_6$	216–218°	Äther	– 24°	69,10 (69,42)	8,35 (8,39)	
IVa	$C_{23}H_{35}O_4J$	212–214°	Äther	+ 19°	55,12 (54,98)	6,87 (7,02)	J: 25,04 (25,26)
IVb	$C_{21}H_{31}O_2J$	182–187°	Methylenchlorid-Isopropyläther	– 7°	57,12 (57,01)	7,08 (7,06)	O: 7,51 (7,23)
IVc	$C_{21}H_{31}O_2J$	238–240°	Methylenchlorid-Äther		56,84 (57,01)	6,97 (7,06)	J: 28,67 (28,69)
VI	$C_{25}H_{38}O_6$	160–161°	Methylenchlorid-Petroläther	+ 18°	69,16 (69,09)	8,60 (8,81)	
IX	$C_{25}H_{34}O_6$	235–238°	Methylenchlorid-Äther	– 34°	69,64 (69,74)	7,92 (7,96)	
XIa	$C_{23}H_{32}O_4$	200–205°	Methylenchlorid-Äther	– 49°	74,36 (74,16)	8,54 (8,66)	
XIb	$C_{23}H_{32}O_4$	220–223°	Hexan	+ 21°	73,92 (74,16)	8,82 (8,66)	
XIc	$C_{23}H_{30}O_5$	190–192°	Aceton-Äther	+ 74°	71,24 (71,48)	7,67 (7,82)	
XId	$C_{25}H_{36}O_6$	226–229°	Äther	0°	68,85 (69,42)	8,25 (8,39)	
XV	$C_{23}H_{34}O_4$	160–164°	Äther-Petroläther	+ 74°	73,60 (73,76)	9,13 (9,15)	
XVI	$C_{23}H_{32}O_5$	196–198°	Methylenchlorid-Äther	+ 73°	70,83 (71,10)	8,05 (8,30)	
XVIIIa	$C_{24}H_{33}O_3N$	145–146°	Methylenchlorid-Isopropyläther	+ 14°	74,94 (75,16)	8,59 (8,67)	N: 3,58 (3,65)
XVIIIb	$C_{24}H_{33}O_3N$	200–202°	Methylenchlorid-Methanol	+ 32°	75,18 (75,16)	8,57 (8,67)	
XVIIIc	$C_{24}H_{35}O_3N$	168–169°	Methylenchlorid-Petroläther	+ 65°	74,69 (74,76)	9,24 (9,15)	N: 3,34 (3,63)
XVIIId	$C_{26}H_{37}O_5N$	209–211°	Methylenchlorid-Petroläther	+ 29°	70,45 (70,40)	8,23 (8,41)	
XVIIIe	$C_{22}H_{29}O_2N$	135–137°	Aceton-Äther	+ 198°	77,72 (77,84)	8,58 (8,61)	N: 4,16 (4,13)

[a] Alle Verbindungen weisen ein mit ihrer Struktur im Einklang stehendes IR-Spektrum auf.
[b] Die optischen Drehungen wurden durch Interpolation der bei den Hg-Linien (in Chloroform; konz. ca. 1) gemessenen Werte erhalten.

Alle beschriebenen Substitutionsreaktionen scheinen über Radikale nach dem eingangs erwähnten Schema zu verlaufen, welches nun, auf diese Reaktionen bezogen, wie folgt dargestellt werden kann (X = Jod oder $Pb(OAc)_3$):



Ob bei einem stetigen Angebot an $J^{\oplus}$ bzw. $Pb(OAc)_4$ aus f entweder i oder k gebildet wird, scheint von den sterischen Voraussetzungen abzuhängen. Sind in f, g und h das Sauerstoffatom und die CH_2-J-Gruppe in einer für den Ringschluss günstigen Lage fixiert (6β-OH und 19-CH_2J, 11β-OH und 18-CH_2J) tritt hauptsächlich Ätherbildung ein. Für die Substitution dürfte ausserdem die bevorzugte Konstellation der CH_2J-Gruppe von Bedeutung sein, die das etwas unterschiedliche Verhalten der 6β- und 11β-Hydroxyverbindungen erklären kann[44].

Die 5-Ring-Aether sind aus den durch Photolyse von tertiären Alkylhypochloriten hergestellten δ-Chloroalkoholen in den meisten Fällen durch Basenbehandlung in einer SN_2-Reaktion erhalten worden[8,17a,19,45], wie dies auch als Schlußstufe der Hofmann-Löffler-Freitag-Reaktion[46] angenommen wird. Für die beobachteten Ringschlüsse f → i und l → m muss auch eine Radikalsubstitution in Betracht gezogen werden, wobei das Jod als Jodatom abgespalten würde (h → i). Diese Reaktion findet eine gewisse Parallele in den von Rust[13,47] beobachteten Ätherbildungen aus einem C-Radikal unter gleichzeitiger Spaltung einer Peroxydbildung, und in der Racemisierung von Alkyljodiden mit Jodatomen[48].

Bei der Nitrilübertragung XVII → XVIII erfolgt die Stabilisierung des zuerst gebildeten 18-C-Radikals durch Wanderung der Nitrilgruppe nach folgendem Schema:

[42] Bei der Reaktion sekundärer Alkohole mit Bleitetraacetat ohne Jodzusatz könnte an Stelle von Jod ein Acetoxyradikal treten (vgl. die Bildung einer 17α-Acetoxyverbindung[6] aus einem fragmentierten Produkt analog c). Versuche zum Nachweis einer f entsprechenden Acetoxyverbindung als Zwischenprodukt dieser Reaktion sind im Gange.

[43] Dieses Zwischenprodukt ist nicht gesichert und nur in Analogie zum Übergang e → f formuliert.

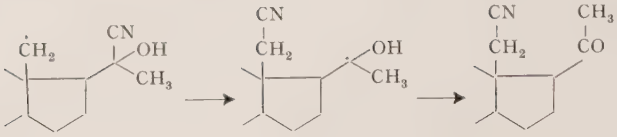
[44] Eine Diskussion der energetischen Verhältnisse und sterischen Voraussetzungen der Reaktionen soll im Zusammenhang mit der ausführlichen Beschreibung der Versuche erfolgen.

[45] Greene[17a] beschreibt allerdings einen Fall, wo anscheinend auch ohne Basenbehandlung ein Äther entsteht.

[46] E. J. Corey und W. R. Hertler, J. Amer. chem. Soc. *82*, 1657 (1960).

[47] E. R. Bell, F. F. Rust und W. E. Vaughan, J. Amer. chem. Soc. *72*, 337 (1950).

[48] R. A. Herrmann und R. M. Noyes, J. Amer. chem. Soc. *78*, 5764 (1956).



Es scheint, dass auch andere Gruppen an C-20 mit einem 18-C-Radikal Reaktionen eingehen können[49].

Alle hier beschriebenen Reaktionen lassen sich also auf ein einziges Schema zurückführen und es scheint, dass dabei die Art und Weise, wie die Sauerstoffradikale gebildet werden (durch Zersetzung von Bleialkoholaten, Photolyse von Nitriten oder von Hypohalogeniten, ja sogar durch Bestrahlung von Carbonylverbindungen), von untergeordneter Bedeutung ist. Auch Stickstoffradikale zeigen weitgehend dieselben Reaktionen[46]. Der folgende Schritt besteht dann immer in einem intramolekularen Entzug von Wasserstoff vom δ-Kohlenstoffatom, falls die sterischen Voraussetzungen für eine solche Reaktion günstig sind.

Unsere Versuche zeigen erneut in eindrücklicher Weise, dass intramolekulare Radikalreaktionen oft in sehr guten Ausbeuten durchgeführt werden können, besonders bei sterisch fixierten Molekülen, und dass sich damit neue synthetische Möglichkeiten eröffnen.

Summary. The intramolecular substitution of the angular methyl groups in steroids by attack of O-radicals derived from 6β-, 11β, and 20-alcohols is discussed. Irrespective of their genesis, these radicals abstract a hydrogen atom from one of the said methyl groups, suitably oriented in δ-position. The C-radicals thus formed give different products depending on the neighbouring groups.

It is shown that 20-hydroxy-18-C-radicals combine with iodine atoms, to give 18-iodides which can be *further substituted* through radicals to give potential 18-oxo-compounds in high yield. In the case of 20-cyanohydrines, the intramolecular reaction of the 18-C-radical with the cyano groups gives rise to the new 18-cyano-20-oxo-steroids.

With 6β- and 11β-O-radicals *single* substitution in 19-position predominates, since the steric arrangement of the primary product favours the intramolecular ether formation over a second substitution reaction.

A general reaction scheme for these transformations is proposed.

CH. MEYSTRE, K. HEUSLER, J. KALVODA, P. WIELAND, G. ANNER und A. WETTSTEIN

Forschungslaboratorien der CIBA Aktiengesellschaft, Pharmazeutische Abteilung, Basel, 17. Juli 1961.

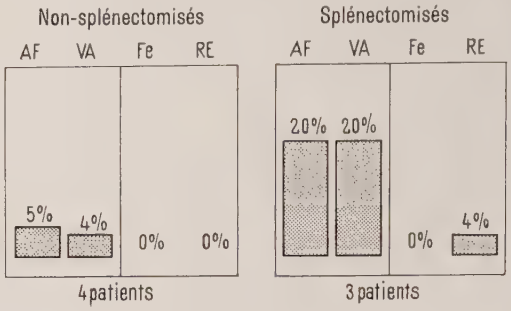
[49] Unveröffentlichte Versuche.

CORRIGENDA

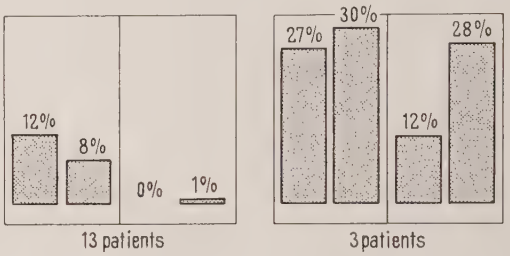
R. SCHINDLER: *Fortschritte und Ergebnisse der Zellkulturmethodik.* Exper. vol. XVII, fasc. 3, p. 97 (1961). Durch ein Missverständnis ist der ursprünglich richtig lautende Satz des Verf. (p. 104, 4. Absatz, Zeile 8) bei der Drucklegung abgeändert worden. Es muss heissen: «Jedoch ist meines Wissens eine solche Desoxyribonukleinsäure-induzierte, genetische Transformation an Säugerzellen nicht beschrieben worden.»

6. Schweizerische elektronenmikroskopische Tagung. A. GAUTIER: *Etude systématique des altérations cellulaires au microscope électronique: application aux érythropathies.* Exper. vol. XVII, fasc. 9, p. 428. Die Legenden der beiden Figuren wurden verwechselt, sie sollten folgendermassen lauten:

Sujets normaux et patients atteints d'affections diverses (mais p de Thalassémie).



Patients atteints de Thalassémie (minime, mineure ou majeure).



(Statistique portant sur 4754 érythrocytes)

Fréquence des altérations constatée dans les érythrocytes de 23 patients.

CONGRESSUS

Belgique

Symposium International de Chimie Organique

Bruxelles, 11–14 juin 1962.

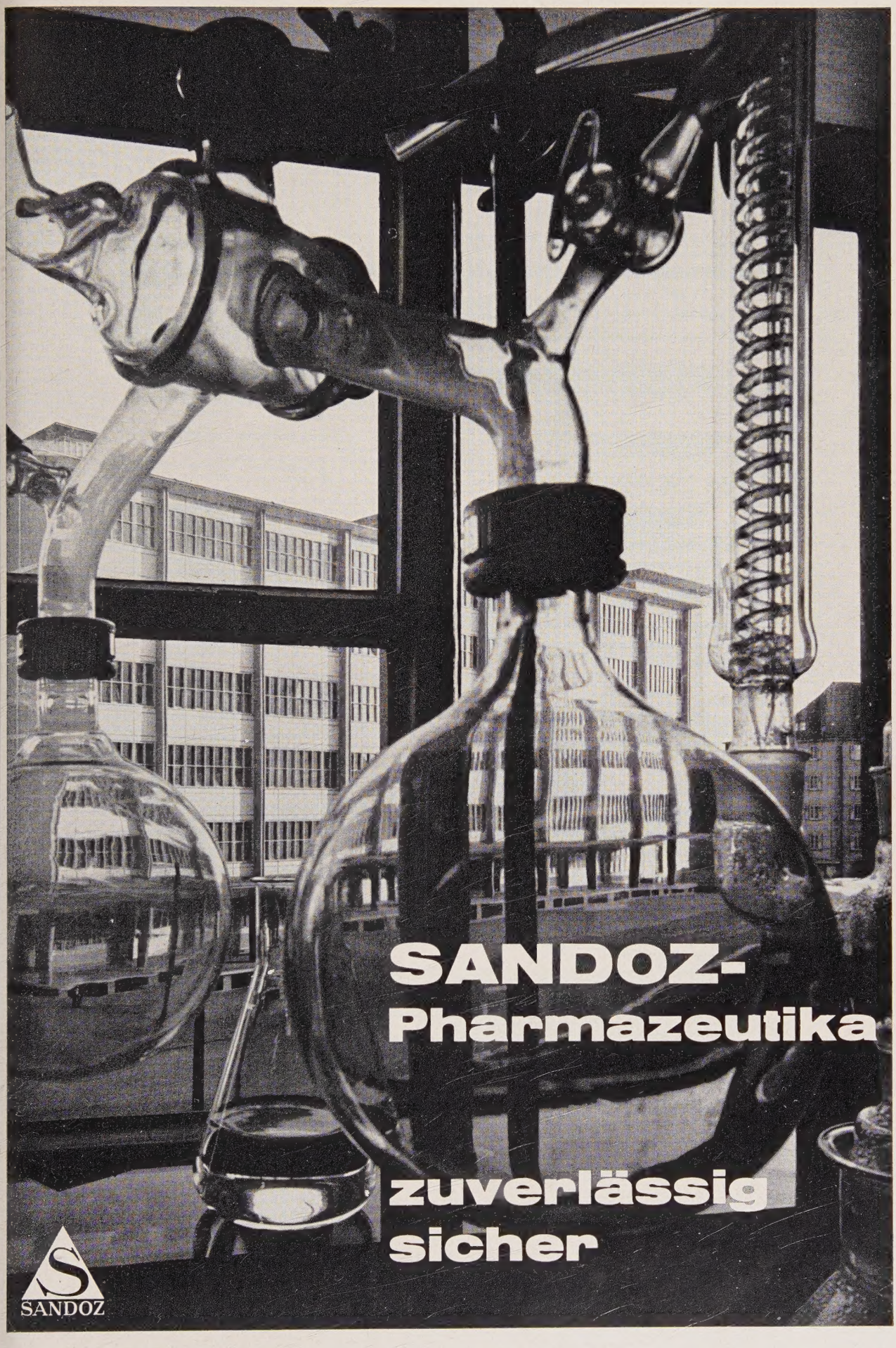
A l'occasion du 75e anniversaire de sa fondation, la Société Chimique de Belgique organise à Bruxelles, du 11 au 14 juin 1962, un *Symposium International de Chimie Organique consacré à l'Etude des Produits Naturels à l'exclusion des Stéroïdes et des Polypeptides.*

Les travaux de ce Congrès qui se tiendra sous les auspices de l'Union Internationale de Chimie Pure et Appliquée (I.U.P.A.C.), seront répartis en 5 Sections, de la manière suivante:

(1) Détermination de la structure de produits naturels nouveaux.
(2) Méthodes d'investigation structurale – Apports nouveaux.
(3) Synthèses et réactions chimiques (à l'exclusion des réactions de dégradation).
(4) Hypothèses biogénétiques.
(5) Mode d'action des produits naturels intervenant dans les processus biologiques.

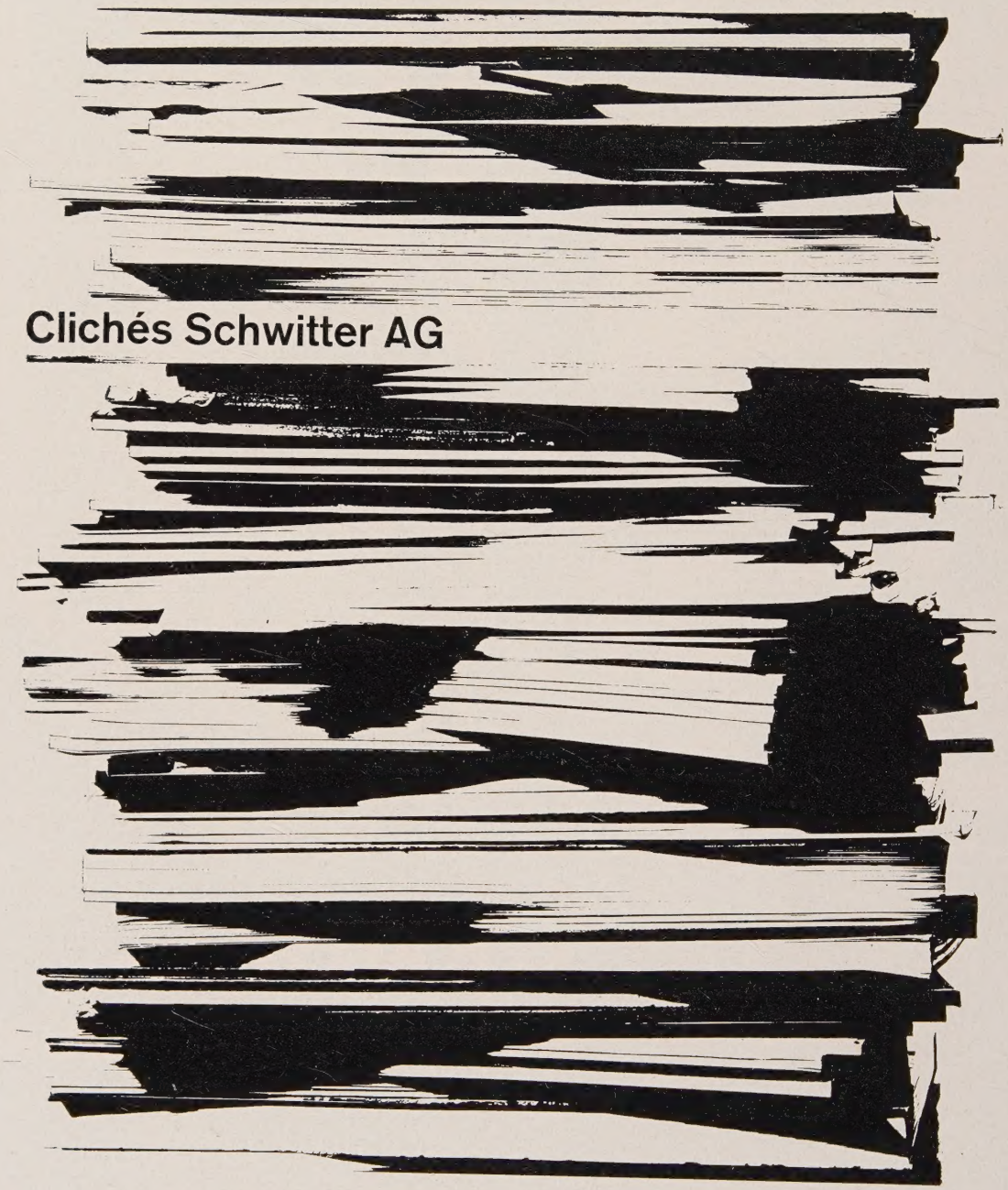
Il est en outre prévu 7 conférences plénières, soit 5 dont le sujet se rapportera successivement à chacune des Sections, une conférence d'ouverture et une de clôture du Congrès.

Secrétariat du Symposium: Mr. Florent MARTIN, D. Sc., 68, rue Berkendael, Bruxelles 6.


SANDOZ-
Pharmazeutika
zuverlässig
sicher
SANDOZ

Clichés Schwitter AG Basel Zürich Lausanne

Martz + Bühlmann



Reihe der experimentellen Biologie

Sammlung Lehrbücher und Monographien aus dem Gebiete der exakten Wissenschaften

Band 1	**Pflanzliche Infektionslehre**	Lehrbuch der allgemeinen Pflanzenpathologie für Biologen, Landwirte, Förster und Pflanzenzüchter. 2. Aufl. Von E. Gäumann (1951). Fr./DM 47.–
Band 2	**Einführung in die physiologische Embryologie**	Von F. E. Lehmann (1946). Fr./DM 38.–
Band 3	**Die Signalübermittlung im Nerven**	Von A. v. Muralt (1946). In Ganzleinen Fr./DM 44.–
Band 4	**Die Pilze**	Grundzüge, ihre Entwicklungsgeschichte und Morphologie. Von E. Gäumann (1949). Fr./DM 39.50
Band 5	**Grundriss zu einer Balneobiologie der Thermen**	Von V. Vouk (1950). Fr./DM 15.–
Band 6–11	**Vergleichende Physiologie**	Von W. v. Buddenbrock Band 1: Sinnesphysiologie (1952). Fr./DM 46.– Band 2: Nervenphysiologie (1953). Fr./DM 39.– Band 3: Ernährung, Wasserhaushalt und Mineralhaushalt der Tiere (1956). Fr./DM 68.– Band 4: Hormone. Leinen (1950). Fr./DM 52.– Band 5: Physiologie der Erfolgsorgane (1960). Fr./DM 54.–
Band 12	**Endosymbiose der Tiere mit pflanzlichen Mikroorganismen**	Von P. Buchner (1953). Fr./DM 66.50
Band 13	**Planen und Auswerten von Versuchen**	Von A. Linder. 2. Auflage (1959). Fr./DM 21.–
Band 14	**Physiologie der Insekten**	Von V. B. Wigglesworth. 2. Auflage (1959). Fr./DM 32.–
Band 15	**Statistische Methoden der Populationsgenetik**	Ein Grundriss für Genetiker, Agronomen und Biomathematiker. Von H. L. Le Roy (1960). Fr./DM 67.50
Allgemein	**Statistische Methoden für Naturwissenschafter, Mediziner und Ingenieure**	Von A. Linder. 3. Auflage (1960). Fr./DM 54.–

Zu beziehen durch Ihre Buchhandlung
Obtainable from your bookseller
Commandes à votre libraire

Birkhäuser Verlag
Basel und Stuttgart

Im November erscheint
To be published in November
A paraître en novembre

Editor: Dr. Ernst Jucker, Basel

Fortschritte der Arzneimittelforschung

Progress in Drug Research

Progrès des recherches pharmaceutiques

Mit dem 1959 erschienenen ersten Band wurde eine Monographienreihe gegründet, die fortlaufend über aktuelle Gebiete der Arzneimittelforschung orientiert. Der demnächst erscheinende dritte Band enthält sechs Übersichtsreferate bekannter Forscher, die ihre Themen erschöpfend behandeln und darüber hinaus noch Anregungen für die Bearbeitung und Weiterentwicklung verschiedener Forschungsgebiete vermitteln. Auch dieser Band schliesst eine Lücke in der Fachliteratur der Arzneimittelforschung, indem er einen Platz zwischen den bekannten Periodica und den grossen Handbüchern und Monographien einnimmt.

The first volume, which appeared in 1959, initiated a new and up-to-date series of progressive reviews covering topical subjects in pharmaceutical research. The third volume contains six revievs by well-known researchers who not only discuss their subjects in detail, but also make suggestions in which direction further work in various research subjects should develop. This volume also fills a gap in the technical literature dealing with pharmaceutical research; its place is between the known periodicals and the comprehensive text books and monographs.

Vol. 3, ca. 570 Seiten, ca. Fr./DM 90.— (1961)

Inhalt/Contents/Sommaire:

N. P. Buu-Hoï, Paris: Les dérivés organiques du fluo
d'intérêt pharmacologique – J. C. Craig and M. R. Tate
Sydney: Structure-Activity Relationships in Certain Anthel
mintics – V. Erspamer, Parma: Recent Research in the
Field of 5-Hydroxytryptamine and Related Indolealkyl
amines – W. Kunz, Monheim: Über neue Arzneimittel –
G. B. West, London: A Pharmacological Approach to
Allergy – Kh. Zepf und Christa Zepf, Ingelheim a. Rhein:
Krebswirksame Antibiotica aus Actinomyceten.

Bisher erschienene Bände:

Vol. 1, 608 Seiten, Fr./DM 68.— (1959)

Inhalt/Contents/Sommaire:

J. Büchi, Zürich: Die Ionenaustauscher und ihre Anwendung in der Pharmazie und Medizin – K. K. Chen and T.-M. Lin, Indianapolis: Cholesterol and Its Relation to Atherosclerosis – H.-A. Oelkers, Hamburg: Die Chemotherapie der Wurmkrankheiten – J. Bally, Basel: Neuere Aspekte der chemischen Anthelminticaforschung – H. Haas, H. Finkund G. Härtfelder, Ludwigshafen: Das Placeboproblem – A. H. Beckett, London: Stereochemical Factors in Biological Activity – W. Kunz, Monheim: Eine Übersicht der neueren Arzneimittel aus den letzten fünf Jahren.

Vol. 2, 636 Seiten, Fr./DM 85.— (1960)

Inhalt/Contents/Sommaire:

K. H. Beyer and J. E. Baer, West Point: Newer Diuretics – B. Camerino and G. Sala, Milano: Anabolic Steroids – C. J. Cavallito and A. P. Gray, Decatur: Chemical Nature and Pharmacological Actions of Quaternary Ammonium Salts – A. Cerletti, Basel: Über Vorkommen und Bedeutung der Indolstruktur in der Medizin und Biologie – W. Kunz, Monheim: Über neue Arzneimittel – K. Nádor, Budapest: Ganglienblocker – A. Pletscher, K. F. Gey und P. Zeller, Basel: Monoaminoxydase-Hemmer – W. A. Sexton, Macclesfield: The Structure and Biogenesis of Certain Antibiotics – D. W. Woolley, New York: Antimetabolites and their Revolution in Pharmacology.

Zu beziehen durch Ihre Buchhandlung
Obtainable from your bookseller
Commandes à votre libraire

Birkhäuser Verlag Basel und Stuttgart